

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kristiin Albert

**Betapapilloomiviiruste transientse replikatsiooni mehhanismi ja tekkivate
intermediaatide uurimine HPV5 näitel**

Magistritöö

Juhendajad: Ene Ustav, Ph.D

Eve Sankovski, M. Sc

TARTU 2013

KASUTATUD LÜHENDID

1D – ühedimensionaalne

2D – kahedimensionaalne

BPV-1 – veise papilloomiviirus (*bovine papilloma virus*)

ccc vorm – kovalentselt suletud tsirkulaarne vorm (*covalently closed circular*)

DBD- DNA-d siduv domään (*DNA binding and dimerization domain*)

DDR- DNA kahjustuse vastus (*DNA damage response*)

dsDNA – kaheaahelaline DNA

E valgud – varajased valgud (*early*)

E2BS – E2 valgu seondumiskoht

E1BS- E1 valgu seondumiskoht

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaathape

E6AP- E3 ubiquitiin ligaas

G₁ faas – rakutsükli faas, mis eelneb raku DNA replikatsioonile

G₂ faas – rakutsükli faas, mis järgneb raku DNA replikatsioonile

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papilloma virus*)

HR- homologiline rekombinatsioon (*Homologous recombination*)

HR- kõrgeriski papilloomiviirus

HSV-1- Herpes simplex viirus 1

IMDM – koekultuuri sööde (*Iscoe's Modified Dulbecco's Medium*)

L valgud – hilised valgud (*late*)

LCR – papilloomiviiruse peamine reguleeriv järjestus (*long control region*) = URR

M faas – rakutsükli mitoosi faas, kus rakk jaguneb tütarakkudeks

MHC I – koesobivuskompleks klass I. (*major histocompatibility complex class I*)

NMSC- mittemelanoomne nahavähk (*non melanoma skin cancer*)

NHEJ- mittehomoloogne otste ühendamine (*Non-homologous end joining*)

OBD- replikatsiooni alguspunkti siduv domään (*origin binding domain*)

OC vorm – avatud, tsirkulaarne vorm (*open circular*)

ORF- avatud lugemisraam (*open reading frame*)

p53 – rakuline tuumorsupressorvalk p53

PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)

pRB – retinoblastoomi valk pRB

PV – papilloomiviirus

RRP- korduv respiratoorne papillomatoos (*recurrent respiratory papillomatosis*)

S-faas – rakutsükli faas, kus toimub raku DNA süntees ja replikatsioon

ssDNA – üheaheelaline DNA

Sp1- transkriptsioonifaktor (*Selective Promoter factor 1*)

SCC- soomusrakuline kartsinoom (*squamous cell carcinoma*)

TAD- transaktivatsiooni domään (*transactivation domain*)

TBP- TATA järjestusele seonduv transkriptsioonifaktor (*TATA binding protein*)

TEF1- transkriptsiooni võimendav faktor

TLR9- TOLL- sarnane retseptor 9 (*Toll like receptor 9*)

U2OS rakuliin – inimese osteosarkoomist algatatud rakuliin

URR – papilloomiviiruse peamine regulatoorne järjestus (*upstream regulatory region*) = LCR

UV kiirgus – ultravioletne kiirgus

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	2
SISUKORD	4
SISSEJUHATUS	6
TEOREETILINE OSA	7
1. Papilloomiviiruste üldiseloomustus	7
1.1 Alfapapilloomiviirused	7
1.2 Betapapilloomiviirused	8
2. Papilloomiviiruse genoom	9
3. Papilloomiviiruse peamiste valkude funktsioonid	10
4. Papilloomiviiruse elutsükel	12
4.1 Viirusinfektsiooni algus	12
4.2 Esmane amplifikatsioon	13
4.3 Stabiilne ehk latentne faas	14
4.4 Vegetatiivne amplifikatsioon	15
5. URR ja minimaalne replikatsiooniks vajalik <i>origin</i>	16
6. DNA kahjustuse vastus ning viiruse genoomi oligomeriseerumine	17
7. U2OS mudelsüsteem	19
EKSPERIMENTAALNE OSA	20
1. Töö eesmärgid	20
2. Materjal ja meetodika	21
2.1. Plasmiidid	21
2.2. Kloneerimine	22
2.3 HPV5 mc genoomi produktsioon	23
2.4. Rakuliinid	24
2.5. Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni meetodil	24
2.6. Madalmolekulaarse DNA eraldamine eukarüootsetest rakkudest Hirt lüüsi meetodil	24
2.7. Southern blot analüüs	25
2.8. 2D geelelektroforees	26
2.9. Western blot analüüs	26
TULEMUSED JA ARUTELU	27

3. Betapapilloomiviiruste transientse replikatsiooni mehhanismi ja tekkivate intermediaatide uurimine HPV5 näitel.	27
3.1. HPV5 genoomi esialgsel amplifikatsioonil tekivad multimeerid	27
3.2. Betapapilloomiviiruse transientse replikatsioonimehhanismi uurimine	32
3.3. Minimaalse <i>cis</i> - piirkonna määramine	35
3.1.1 HPV 5 E1 ekspressioonivektori konstrueerimine ja testimine U2OS rakuliinis	36
3.1.2. HPV5 minimaalsete originikonstruktide disain ja konstrueerimine	37
3.1.3 Originikonstruktide replikatsiooni määramine	39
KOKKUVÕTE.....	44
RÉSUMÉ.....	45
KASUTATUD KIRJANDUS.....	46
LISAD.....	52
Lisa1.....	52
Lisa 2.....	53
Lisa 3.....	54

SISSEJUHATUS

Inimese papilloomiviirused on meditsiiniliselt olulised patogeenid, mis nakatavad limaskesti ja nahka ning mille erinevaid tüvesid seostatakse emakakaela-, anogenitaal-, pea ja kaela- ning mittemelanoomse vähkkasvaja tekkega (Cogliano et al., 2005; Fakhry et al., 2008). HPV elutegevuse molekulaarseid aluseid on raske uurida, sest nende elutsükkel on tihedas sõltuvuses keratinotsüütide diferentseerumisest. Sarnaseid tingimusi luua *in vitro* on aga keeruline. Limaskesti nakatavate papilloomiviiruste replikatsiooni uurimist võimaldavad erinevaid naha kihte jäljendavad parvkultuurid, kus alfa-HPVd on suutelised rekonstrueerima viiruse kõiki elutsükli faase kuni nakatumisvõimeliste viirusosakeste tekkeni. Samas nahka nakatavad beta HPV viirustüübid ei ole võimelised neis replitseerima. Seeõttu on nahka nakatavate papilloomiviiruste replikatsiooni molekulaarsete mehhanismide kohta väga vähe teada.

Tartu Ülikooli papilloomiviiruste uurimise töörühmas töötati välja U2OS rakuliinil põhinev mudelsüsteem, milles replitseeruvad edukalt nii transientses kui stabiilses faasis erinevad naha- ja limaskestade papilloomiviirused. Seega tekkis meil võimalus uurida nahka nakatavate papilloomiviiruste replikatsioonitsükli, identifitseerida replikatsiooniks vajalikke valke, uurida replikatsiooni mehhanismi ja selgitada välja viiruse replikatsiooni initsiatsiooni eest vastutavad järjestused viiruse genoomis.

Teoreetilises osas annan ülevaate papilloomiviiruste eri tüüpidest ning kirjeldan viiruse elutsükli. Lisaks toon välja teada olevaid erinevusi peamiselt limaskesti nakatavate alfa-papilloomiviiruste ja nahka nakatavate betapapilloomiviiruste vahel.

Eksperimentaalses osas uurin betapapilloomiviiruse replikatsioonimehhanismi analüüsides replikatsiooni intermediaatide ning kaardistan replikatsiooniks vajalikku minimaalset cis- järjestust.

Töö on teostatud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis ning selle valmimise eest olen tänulik oma juhendajatele Eve Sankovskile ja Ene Ustavile. Samuti tänan kõiki töörühma liikmeid toetuse eest.

TEOREETILINE OSA

1. Papilloomiviiruste üldisloomustus

Papilloomiviirused (PV) on sugukonda *Papillomaviridae* kuuluvad laia peremeesringkonnaga kõrge koespetsiifilisusega DNA viirused. Hetkel teadaolevalt on identifitseeritud 189 viiruse tüve, millest 120 on suutelised nakatama inimest. Lisaks võimele nakatada imetajaid on leitud üksikuid tüvesid, mille peremeesorganismideks on linnud ja reptiilid (Bernard et al 2010.). Viirus on liigspetsiifiline ja nakatab peremeesorganismi epiteelkudet tekitades limaskestadel kondüloome ja nahal papilloome ehk soolatüükaid, mis reeglina on healoomulised lokaalsed kasvaja. Mõnedel juhtudel võib viirus püsida latentse faasis aastaid ning olla etioloogiliseks agendiks vähkkasvajate tekkes. (Richardson et al., 2003) Papilloomiviirused nakatavad nahavigastuse kaudu basaalseid jagunemisvõimelisi rakke ning nende elutsükkel on tihedalt seotud keratinotsüütide diferentseerumisega. Produktiivse viirusinfektsiooni korral säilib viiruse genoom rakkude tuumades multikoopiaalse ekstrakromosomaalse geneetilise elemendina. Mõnede kõrge riski alfa-papilloomiviiruste poolt indutseeritud vähkkasvajates on viiruse genoom leitud integreerununa peremeesraku genoomi (Zheng and Baker, 2006).

Inimese papilloomiviirused (HPV) on jaotatud virioni põhilise kapsiidi valguga L1 lugemisraami järjestuse alusel viiete perekonda, millest suurimad on peamiselt limaskesti nakatavad alfa-papilloomiviirused ja nahka nakatavad betapapilloomiviirused (Bernard et al.; de Villiers et al., 2004). Võime järgi põhjustada hea- ja halvaloomulisi kasvajaid jagatakse nii limaskestade kui nahapapilloomiviirused vastavalt kõrge- ja madalariski tüüpideks (Barbosa et al., 1991; McLaughlin-Drubin and Munger, 2008).

1.1 Alfapapilloomiviirused

Alfapapilloomiviirused nakatavad peamiselt limaskesti, kuid perekonnas leidub ka nahka nakatavaid viirustüvesid. Kõrgeriski (HR) alfapapilloomiviiruse infektsioon on üheks peamiseks põhjuseks emakakaela vähkkasvaja tekkes (Stanley, 2008). 1999. aastal näidati, et 99,7% emakakaelavähi biopsiatest sisaldasid kõrgeriski alfapapilloomiviiruse genoomi, millest kõige sagedamini olid esindatud HPV16, HPV18, HPV31 ja HPV33 (Walboomers et

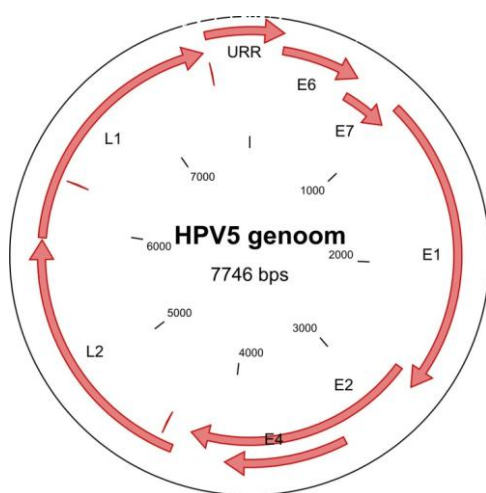
al., 1999). Lisaks emakakaelavähile põhjustavad kõrgeriski viirustüved pea ja kaela piirkonna ning anogenitaalkasvajaid (Cogliano et al., 2005; Fakhry et al., 2008). Vähkkasvaja puhul on viiruse genoom sageli, aga mitte alati integreerunud peremeesraku genoomi (Zheng and Baker, 2006). Madalariski (LR) alfabapilloomiviiruste nakkused on laialt levinud ja põhjustavad healoomulisi kondüloome, mis pahaloomuliseks vähkkasvajaks üldjuhul ei arene. Näiteks arvatakse, et sugulisel teel levivate tüvedega HPV6 ja HPV11 on nakatunud kuni 1% seksuaalselt aktiivsest elanikkonnast (Brentjens et al., 2002). Viimasel ajal on siiski näidatud, et HPV6 ja HPV11 võivad osaleda ohtliku haigusseisundi korduv respiratoorne papilloomatoos (RRP) tekkel, mille puhul neelu, kõripiirkonda ja kopsutrahheasse tekivad papilloomid, mis oluliselt takistavad hingamist (Kanazawa et al., 2013; Katsenos and Becker, 2011).

1.2 Betapapilloomiviirused

Kõik betapapilloomiviirused nakatavad nahka ning neid peetakse reeglina naha normaalse mikrofloora osaks (Antonsson et al., 2003; Weissenborn et al., 2012). Seega võib viirus oma elutsükli edukalt lõpule viia asümptomaatiliselt, kuid kõige tavalisemad tunnused on soolatüükad ning mitut tüüpi papilloomid. Nahka nakatavad betapapilloomiviirused võib samuti jagada kõrge- ja madalariski tüüpideks. Kõrgeriksi viirusteks loetakse HPV5 ja HPV8, mille puhul on täheldatud seos viirusnakkuse ja mittemelanoomse nahavähi (NMSC) vahel. NMSC ohtlikumaks vormiks on soomusrakuline kartsinoom (SCC) (Harwood et al., 2004). Haigestumise riskigruppi kuuluvad immuunpuudulikkusega ja haruldast geneetilist haigust *epidermodysplasia verruciformis* põdevad inimesed. Sel juhul ei suuda organism betapapilloomi viirusinfektsiooni alla suruda ning nahale tekib rohkelt healoomulisi kasvajaid ja sarvjaid tüükaid, mis võivad edasi areneda soomusrakuliseks kartsinoomiks päikesele avatud kehapiirkondades (Nindl et al., 2007). Siiski ei peeta viirusinfektsiooni ainsaks vähki põhjustavas teguriks, vaid arvatakse, et viirusnakkuse olemasolul ei suunata igapäevase UV kiirguse tagajärjel tekkinud kahjustustega rakke apoptoosi, mis omakorda soodustab mutatsioonidega rakkude kuhjumist ning seega võimaldab vähiraku arengut (Aldabagh et al., 2013).

2. Papilloomiviiruse genoom

Alfa- ja betapapilloomiviirustel on sarnane genoomi ülesehitus. Kõikidel HPV-del on ümbriseta ikosaeedriline virion, milles paikneb 8kb suurune nukleosoomidesse pakitud kaheahelaline DNA (dsDNA) rõngasmolekul, millel vaid ühel ahelal paiknevatelt avatud lugemisraamidelt (ORF-*open reading frame*) kodeeritakse kõik viirusvalgud. Genoomil eristatakse kolme regiooni: varajane kodeeriv ala (E – *early*), hiline kodeeriv ala (L – *late*) ja mittekodeeriv regulatoorne ala (URR – *upstream regulatory region* või LCR – *long control region*). Varajane regioon hõlmab üle 50% viiruse genoomist ja alfabapilloomiviirustel kodeerib seitset avatud lugemisraami – E1, E2, E4, E5, E6, E7 ja E8. Betapapilloomiviirustel E5 lugemisraam puudub (de Villiers et al., 2004). Hiliselt kodeerivalt alalt transkribeeritakse kahte hilist valku, peamist kapsiidivalku L1 ja minoorset kapsiidivalku L2, mida mõlemat ekspresseeritakse alles viiruse replikatsioonistaadiumi lõppjärgus (Zheng and Baker, 2006). URR-i ala paikneb L1 ja E6 avatud lugemisraamide vahel ning seal paikneb enamik viiruse replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikke *cis*-elemente – transkriptsioonifaktorite seondumiskohti, replikatsiooni alguspunkti (origin) ja mitmeid promootoreid (Bernard, 2013). Ahelalt kodeeritavad mRNA-d on reeglina polütsistronsed ja küpsenud mRNA-d saadakse alternatiivse RNA splaissingu abil (Zheng and Baker, 2006). Viirusel on kaks peamist promootorit, varajane asub E6 lugemisraami ees ja suunab varajaste valkude mRNA-de sünteesi, hiline promootor asub E7 lugemisraamis ja käivitub diferentseeruvates rakkudes kodeerides hiliste valkude sünteesi.



Joonis 1. HPV5 genoom. Joonisel on kujutatud HPV5 genoom koos selles paiknevate varaste (E1, E2, E4, E6, E7) ja hiliste (L1, L2) lugemisraamidega ning URR-i piirkonnaga.

3. Papilloomiviiruse peamiste valkude funktsioonid

E1 valk on põhiline initsiaatorvalk viiruse DNA replikatsiooniks. Ta on konserveerunud ATP-sõltuv DNA helikaas, mis seondub originipiirkonda ja sulatab ahelad lahti viiruse DNA replikatsiooni alustamiseks. E1 valk on madala järjestusspetsiifilisusega ning valgu seondumise jaoks DNA õigesse piirkonda läheb vaja ka E2 olemasolu (Ustav et al., 1991). E1 valk koosneb kolmest funktsionaalsest domäänist: C-terminaalne domään omab ATP hüdrolyüsi ja helikaasi aktiivsust, keskmine *hinge* regioon vastutab spetsiifilise seondumise eest DNA-ga ning N-terminaalses domäänis asuvad tuuma lokaliseerimise ja tuumast ekspordimise signaalid. N-terminaalne regioon on vajalik viiruse paljunemiseks *in vivo* kuid mitte *in vitro* (Fradet-Turcotte et al., 2010). E1 valgu ebaspetsiifika tuleneb sellest, et see on suuteline DNA-ga interakteeruma läbi *hinge*-regiooni, mille puhul on seondumine tugev ja spetsiifiline ning läbi helikaasse domääni, mille puhul valk seondub DNA-ga ebaspetsiifiliselt. On näidatud, et E2 olemasolu inhibeerib C-terminaalse piirkonna ebaspetsiifilist seondumist DNA-le ning sellega tõstab E1 valgu järjestusspetsiifilisust (Chen and Stenlund, 2002). E1 seondumine DNA-ga toimub URR-i piirkonnas asuvas palindroomses E1 seondumissaidis (E1BS). Kuna papilloomiviirus kasutab replitseerumiseks peremeesraku replikatsioonisüsteeme, interakteerub E1 raku poolsete replikatsioonivalkudega ning toimetab need replikatsioonitsentritesse (Chow and Broker, 1994). E1 valgu ekspressioon toimub polütsistronselt mRNAlt, mis sisaldab lisaks ka E6 ja E7 valgu lugemisraame (Kadaja et al., 2007; Remm et al., 1999).

E2 valk on multifunktsionaalne mitmedomäänne regulatoorne valk, mis osaleb viiruse DNA replikatsiooni initsieerimises, transkriptsiooni reguleerimises ning viiruse genoomi segregatsioonis raku mitoosifaasis. E2 valgu interaktioom rakus koosneb vähemalt 98 rakulisest faktorist (Muller and Demeret, 2012). Täispikk E2 valk koosneb N-terminaalsest transaktivatsiooni ja C-terminaalsest DNA sidumise domäänist, mis on omavahel ühendatud *hinge*- regiooniga. E2 valk reguleerib replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumist seondudes 12 aluspaari pikkustele palindroomsetele järjestusele URR-i piirkonnas, mida nimetatakse E2 seondumiskohtadeks (E2BS, *E2 binding site*) ning vastavalt seondumiskohale represseerib või soodustab replikatsiooni või transkriptsiooni toimumist. E2 valk omab erinevate seondumiskohtade suhtes erinevat afiinsust ja valgu kontsentratsioonist sõltuvalt oleneb, millised seondumispaid on hõivatud. Limaskesti nakatavatel HPV-del ühtivad kaks E2 seondumiskohta varajase promooteri alaga ning kui E2 neile seondub on segatud

transkriptsioonifaktorite Sp1 ja TBP seundumine DNA-le ning transkriptsioon on pärsitud (Demeret et al., 1997; Dong et al., 1994). Betapapilloomiviirustes asuvad E2 seundumiskohad transkriptsiooni initsiatsiooni saidist kaugemal ning seega arvatakse, et E2 seundumine viib alati transkriptsiooni aktivatsioonini (Guido et al., 1992). Iga papilloomiviiruse URR-i piirkond sisaldab vähemalt nelja E2 seundumissaiti (McBride et al., 2006).

E1^{E4} liitvalku kodeeritakse viiruse elutsükli hilises faasis. On näidatud, et E1^{E4} tekitab rakutsükli peatumise G2/M faasis, lisaks osaleb valk keratiini filamentide ümberkorraldamises, mida seostatakse viiruspartiklite efektiivsema vabastamisega keskkonda (Nakahara et al., 2005).

HPV E5, E6, E7 on papilloomiviiruste onkovaalgu. Kõrgeriski alfabapilloomiviiruste E6 interakteerub rakulise E3 ubikvitiin ligaasiga (E6AP) ning suunab rakulise p53 tuumorsupressorvalgu proteolüütilisele lagundamisele, mille tulemusel välditakse peremeesraku apoptoosi (Li and Coffino, 1996). Betapapilloomiviiruste ja madalariski alfabapilloomiviiruste E6 valgu puhul p53 degradeerimist ei ole täheldatud, küll on aga uuringutest selgunud, et β -papilloomiviiruste E6 võib UV kiirguse järgselt suunata lagundamisele proapoptootilise molekuli Bak, mistõttu ei avane tsütokroom C kanalid mitokondri membraanis ning seetõttu ei kutsuta esile apoptoosi induktsiooni (Underbrink et al., 2008).

E7 valk seondub rakutsükli negatiivse regulaatori retinoblastoomi (pRb) perekonna valkudega ning suunab need lagundamisele. Selle tulemusel püsivad E2F transkriptsioonifaktorid aktiivses olekus ja rakk suunatakse rakutsükli S faasi. E6 ja E7 koosmõjul hoitakse rakk aktiivselt jagunevana ning see soodustab genoomset ebastabiilsust, mis võib viia mutatsioonide kuhjumiseni (Duensing and Munger, 2004). Samuti mõjutavad onkovaalgu peremeesorganismi immuunsüsteemi, näiteks inhibeeritakse kaheaheelalist DNA-d ära tundvate TOLL sarnaste retseptorite (TLR9) ekspressiooni (Ghittoni et al., 2010) ja põhilise koosobivuskompleksi I (MHCI) ekspressiooni.

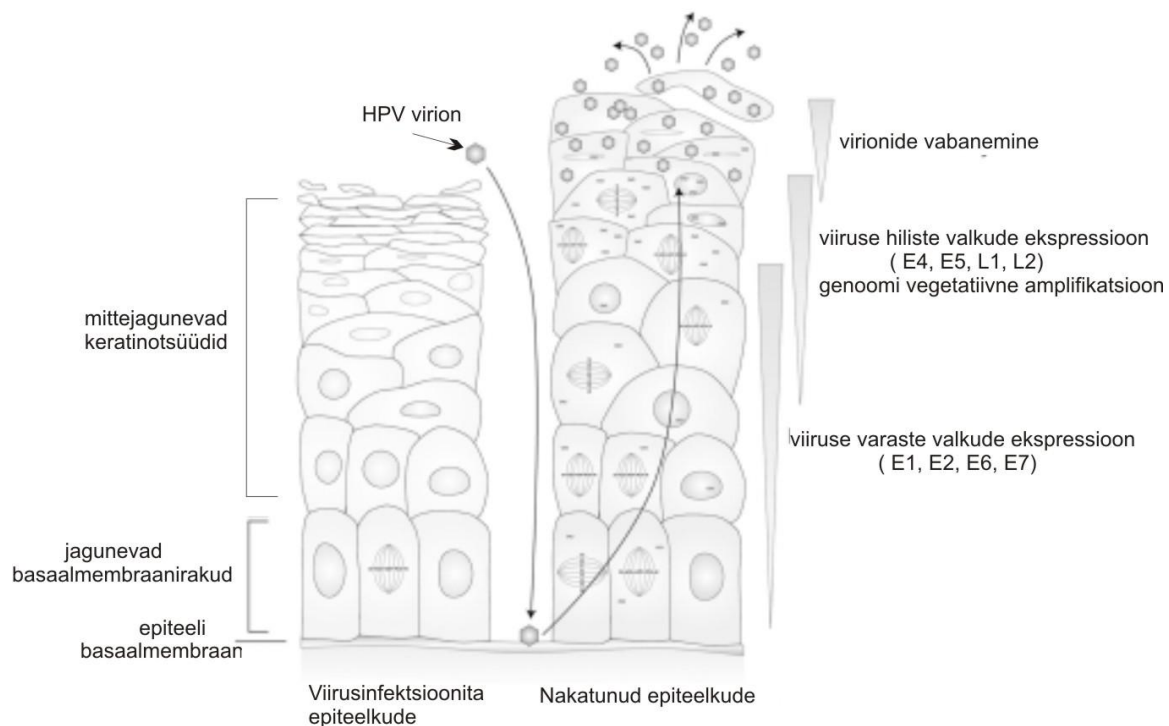
Kapsiidivalke L1 ja L2 hakkab papilloomiviirus ekspresseerima terminaalselt diferentseerunud keratinotsüütides enne virionide pakkimist ja vabanemist keskkonda. Peamine kapsiidivalk L1 moodustab 72 kapsomeerist koosneva kapsiidi. Arvatakse, et L2

valk muudab viiruse DNA pakkimist virioni efektiivsemaks ning mängib rolli virioni suuremal nakatumisvõimel (Stauffer et al., 1998).

4. Papilloomiviiruse elutsükel

4.1 Viirusinfektsiooni algus

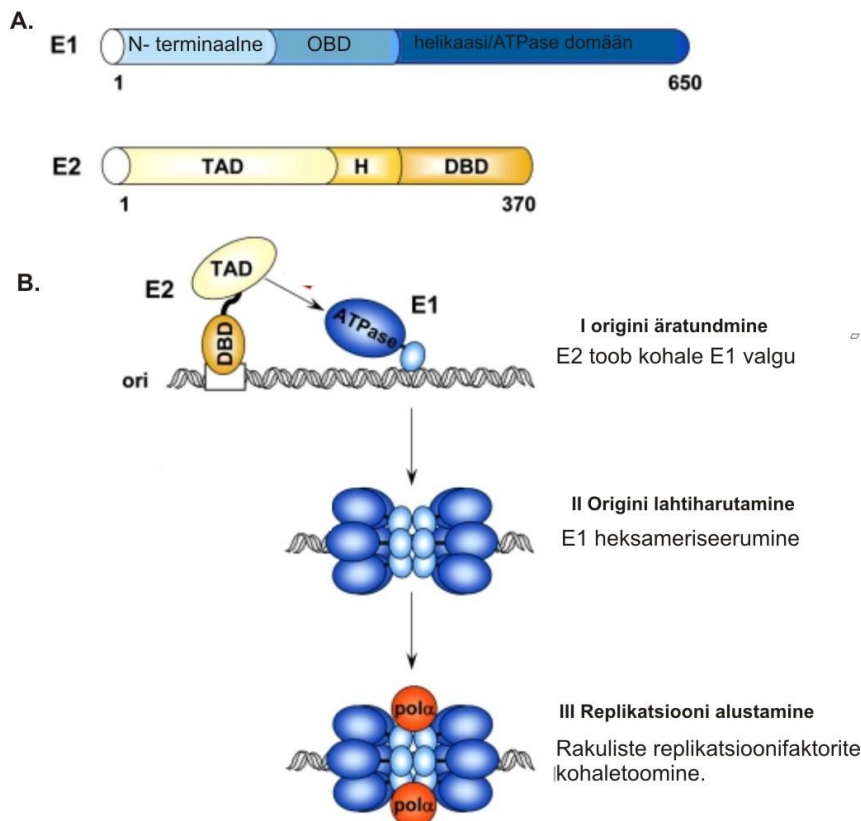
Papilloomiviirused on väga koespetsiifilised ning nende elutsükel on tugevalt seotud epiteeli peamise rakutüübi- keratinotsüütide diferentseerumisega. Normaalses epiteelkoes on jagunemisvõimelised ainult basaalkihi rakud. Rakujagunemisel jääb üks tütarakk basaalmembraanile ja säilitab jagunemisvõime, teine migreerub ülemistesse rakukihtidesse kaotab diferentseerumisprotsessis replikatsioonivõime ja läbib lõpuks programmeeritud rakusurma (Bodily and Laimins, 2011). Püsiva nakkuse tekkimise jaoks peab viiruspartikkel pääsema epiteelkoe vigastuse kaudu jagunemisvõimeliste rakkudeni. Lisaks basaalmembraanile asub selliseid rakke palju karvanääpsu kanali põhjas, seega on võimalik, et nahka nakatavatele papilloomiviirustele võib see olla oluline viiruse sisenemise koht ja hilisem reservuaar (Doorbar, 2005; Feltkamp et al., 2008). Täpsed mehhanismid viirusosakeste rakku sisenemisel ei ole teada, kuid arvatakse, et selles osalevad heparaan sulfaat (Giroglou et al., 2001), alfa integriin või laminiin 5 (Patterson et al., 2005) ning rakku sisenemine toimub läbi klatriin vahendatud endotsütoosi (Culp and Christensen, 2004). Viiruse elutsükel jagatakse replikatsiooni alusel kolmeks osaks- esmane viiruse genoomi amplifikatsioon rakku sisenemisel, stabiilne ehk latentne faas, mille jooksul viiruse koopiarv rakus ei muutu ning teistkordne PV genoomi vegetatiivne amplifikatsioon, virionide kokkupakkimine ja vabanemine. Kaks esimest faasi toimuvad basaalmembraani rakkudes ning viimane juba diferentseeruvates keratinotsüütides.



Joonis 2. Inimese papilloomiviiruse elutsükli ülevaade. Viirus siseneb epiteeli nahahaava kaudu ja nakatab jagunevaid basaakihi rakke. Viiruse elutsükkel on tihedalt seotud keratinotsüütide diferentseerumisega. Vasakul pool on kujutatud nakatumata epiteelkude ning paremal pool viirusega nakatunud epiteelkude. Lisaks on välja toodud eri etappidel ekspresseeritavad valgud (Kajitani et al., 2012).

4.2 Esmase amplifikatsioon

Pärast viiruse jõudmist rakutuuma käivitatakse viiruse genoomi esmane lühiajaline amplifikatsioon, mille lõppedes on ühes peremeesrakus kuni 200 koopiat viiruse genoomi (Doorbar et al., 2012; Moody and Laimins, 2010). Viirusel endal puudub replikatsiooniks vajalik mehhanism seega kasutatakse enda paljundamiseks ära peremeesraku replikatsioonisüsteemi. Esmase replikatsiooni initseerimiseks peavad viirusvalgud E1 ja E2 moodustama kompleksi ning seostuma järjestusspetsiifiliselt replikatsiooni originile URR-i regioonis (Ustav et al., 1993; Ustav et al., 1991). Origin asub URR-i piirkonnas, sisaldab seondumiskohti E1 ja E2 valgule ning AT rikast piirkonda (Remm et al., 1992). E1-E2 kompleksi seondumisele järgneb heksameerse E1 kompleksi teke, E2 vabanemine ning rakuliste replikatsioonifaktorite kohaletoomine. Kaitsmaks viirust peremeesraku immuunsüsteemi eest hoitakse viiruse valkude ja genoomi koopiaarvu basaalmembraani rakkudes suhteliselt madalal tasemel.



Joonis 3. **A.** Skemaatiline ülevaade viiruse replikatsiooniks vajalike valkude E1 ja E2 ülesehitusest. E1 ja E2 on vastavalt umbes 650 ja 370 aminohappe pikkused ning sisaldavad erinevaid funktsioone täitvaid domääne. E1 valgu regioonid: N- terminaalne domään, OBD- *origini* (DNA-d) siduv domään, N terminaalne helikaasset/ ATPaaset aktiivsust omav domään. E2 valgu regioonid: TAD- transaktivatsiooni domään, H- *hinge* regioon, DBD- DNA-d siduv domään. **B.** Viirusliku DNA replikatsiooni initsiatsioon. (I) E2 valk (kollane) toob E1 (sinine) replikatsiooni origini piirkonda ning moodustub E1-E2- DNA kompleks. Pärast järgmiste E1 valkude liitmist E2 vabaneb (II) Kompleksi liidetakse juurde E1 valgu molekule ning moodustuvad kaks heksameerset helikaasi ning algab DNA ahelate lahtisulatamine. (III) Kohale tuuakse rakulised replikatsioonifaktorid ning algab kahe-suunaline DNA replikatsioon (D'Abramo and Archambault, 2011).

4.3 Stabiilne ehk latentne faas

Pärast esialgset amplifikatsiooni hakkab viirus replitseerima sünkroonselt peremeesrakuga, s.t. viiruse koopiaarv püsib ligikaudu muutumatul tasemel ning viiruslikku DNA-d paljundatakse umbes ühe korra rakutsükli jooksul. Stabiilse replikatsiooni toimumise jaoks on kaks mudelit, millest esimese puhul arvatakse, et viiruse DNA kahekordistub nagu rakuline DNA-gi ühe korra rakutsükli S faasis ning replikatsioon on kontrollitud rakuliste transkriptsioonifaktorite poolt. Teise mudeli kohaselt toimub viiruse genoomi replitseerumine juhuslikult, osad viirusemolekulid replitseeruvad mitu korda rakutsükli S faasis, osad vaid ühe korra ning osad mitte üldse (Hoffmann et al., 2006). Mõlemad teooriad tagaksid viiruse

genoomi koopiarvu säilumise esialgsel tasemel, kuid kummagi õigsust ei ole suudetud seni näidata. Selleks, et viiruseinfektsioon ei kaoks, peab igal juhul viirus jagunema tekkivate tütarakkude vahel ligikaudu võrdselt. On näidatud, et papilloomiviiruse genoom ankurdatakse rakujagunemisel E2 valgu vahendusel peremeesraku tütarakkude kondenseerunud kromosoomide külge, kindlustades seeläbi oma genoomi võrdse segregatsiooni (Bastien and McBride, 2000; Ilves et al., 1999). Alfapapilloomiviiruste puhul on näidatud replikatsiooni toimumist stabiilses elutsükli bidirektsionaalselt kulgeva *theta* mehhanismi järgi (Flores and Lambert, 1997). Betapapilloomiviiruste puhul vastavad andmed seni puuduvad. Theta mehhanism on üks levinumaid meetodeid tsirkulaarsete genoomide replitseerimiseks, selle käigus sulatatakse kaheaahelaline DNA lahti ning replikatsioonikahvlid hakkavad liikuma kahes suunas (del Solar et al., 1998). Replikatsiooni mehhanismi ja tekkivaid intermediaate on uuritud kahedimensionaalse geelelektroforeesi analüüsil (Schvartzman et al., 2012).

4.4 Vegetatiivne amplifikatsioon

Viiruse hilise elutsükkel algab kui PV peremeesrakk migreerub epiteelis ülespoole ning alustab diferentseerumist. Ilma viirusinfektsioonita kaotavad basaalmembraanist eemalduvad keratinotsüüdid jagunemisvõime, kuid viirusinfektsiooni puhul hoitakse rakke aktiivses jagunemises. Seda peamiselt tänu E7 valgu interaktsioonidega pRb perekonna valkudega. Raku diferentseerumisprotsess aktiveerib viiruse hilise promoteri ning kõikide varajaste valkude tase tõuseb mitmekordselt. Viiruse genoomi koopiarv tõuseb paarisajalt mitme tuhande koopiani rakus (Bedell et al., 1991). Pärast genoomi amplifikatsiooni toimub L1 ja L2 valkude süntees ning viiruse genoomi pakkimine virionidesse. Papilloomiviirused on mittelüütilised ja seega vabanevad virionid peremeesrakkude jõudmisel epiteeli pinnale koos surnud naharakkudega (Doorbar, 2005). Teistkordse viiruse genoomi amplifikatsiooni käigus ei teki *theta* struktuurile omaseid replikatsiooni intermediaate. *Theta* mudeli järgi replitseerumisel vajatakse iga replikatsioonitsükli toimumiseks uut replikatsiooni initseerimist E1-E2 valgu kompleksi moodustumise näol ning see võib olla põhjus, miks viiruse hilisemas elutsükli toimub replikatsiooni ümberlülitamine teisele, seni veel täpselt kindlaks tegemata mehhanismile (Flores and Lambert, 1997)

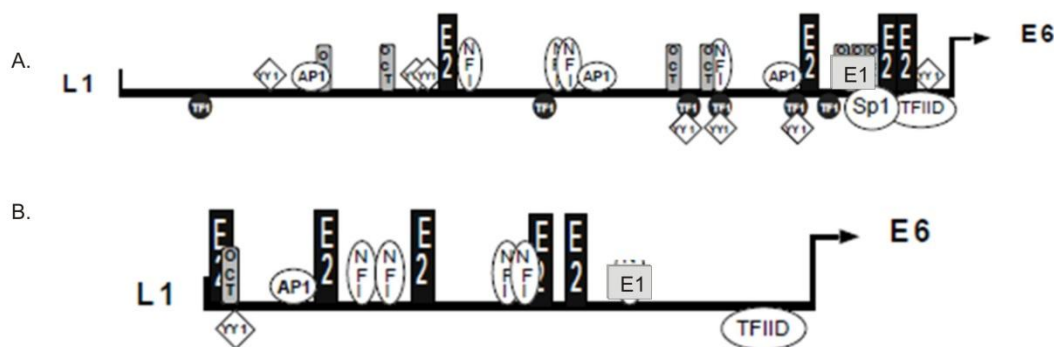
5. URR ja minimaalne replikatsiooniks vajalik *origin*

Mittatransleerivalt reguleerivalt ei kodeerita mitte ühtegi valku, küll asuvad seal aga enamik viiruse replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikke *cis*-elemente. Erinevus URR-i pikkuses ja organiseerituses on eri papilloomiviiruste perekondade vahel suur, ulatudes 478 aluspaarist HPV5 puhul kuni 953 aluspaarini HPV31 puhul (O'Connor 1995). Suured erinevused piirkonnas on põhjustatud URR-i kiiremast divergeerumisest ülejäänud genoomiga võrreldes (Garcia-Vallve et al., 2006). Vaatamata oma erinevustele on kõikides URR-ides vähemalt neli E2 valgu seondumiskohta, vähemalt 1 E1 valgu seondumiskoht, 1 hiline polüadenüleerimissait ning A/T rikas järjestus. Alfapapilloomiviiruste reguleerivas alas on 4 E2BS-i, mis jaotavad URR-i funktsionaalseteks osadeks- 5'-, keskmine ja 3'-regioon (O'Connor et al 1995). 5'-regioon on umbes 300 bp pikkune ja sisaldab endas viiruse hilises elutsükli produktseeritavate transkriptide polüadenüleerimise ja transkriptsiooni terminatsiooni saite. Keskmine osa ulatub 400 aluspaarini ning piirneb kahe E2BS-iga. Sinna piirkonda kinnituvad enamik transkriptsiooni aktivaatoritest. (Chin et al., 1989). Teise E2BS ja E6 lugemisraami vahele jääb lühike umbes 150 aluspaarist koosnev 3' regioon, kus asub E1 valgu seondumissait. Selles piirkonnas asub transkriptsiooni alguspunkt, 2 E2 seondumissaiti ning rakulise transkriptsioonifaktori Sp1 seondumissait. Betapapilloomiviiruste URR-i on palju vähem uuritud ning nende puhul on teada viie erineva E2 seondumiskoha ja 1 E1 seondumiskoha olemasolu. Kaua aega papilloomiviiruste uurimise mudelobjektiks olnud veise papilloomiviiruse (BPV) puhul on leitud 17 seondumiskohta E2 valgule.

URR-ile seondub rohkem kui 30 erinevat transkriptsioonifaktorit ning on näidatud, et varieeruvus transkriptsioonifaktorite seondumiskohtade näol on perekondade vahel suur (Garcia-Vallve et al., 2006). Näiteks on teada, et betapapilloomiviiruste puhul puudub URR-is seondumiskoht alfapapilloomiviiruste puhul olulistele transkriptsioonifaktoritele SP-1 ja TEF1.

Minimaalne origin on defineeritud kui väikseim *cis*-järjestusi sisaldav regioon, mis suudab toetada replikatsiooni toimumist *trans*-faktorite olemasolul (del Solar et al., 1998). Papilloomiviiruste puhul on vajalikeks viiruslikeks *trans*-faktoriteks valgud E1 ja E2. Üldjuhul sisaldab minimaalne origin ühte E1 ja kahte E2 valgu seondumissaiti. Veise papilloomiviiruse puhul on näidatud, et viiruse origin on 90 aluspaari pikkune ning sisaldab ühte E1 seondumiskohta, 2 E2 seondumiskohta ja A/ T rikast piirkonda (Ustav et al., 1991). HPV 11 puhul on kindaks tehtud, et replikatsiooni toimumiseks piisab URR-i fragmendist,

mis sisaldab kahte E2 seondumissaiti või E2 seondumiskohta ja AT rikast järjestust (Lu et al., 1993). HPV 18 puhul on näidatud 2 E2BS-i või ühe E2BS-i ja E1BS-i funktsioneerimisest minimaalse originina. Lisaks suudab HPV18 puhul originina töötada ka 33 aluspaari pikkune sünteetiline oligo, mis sisaldas kahte E2BS-i järjestust (Sverdrup and Khan, 1995). Katseid määramaks betapapilloomiviiruste minimaalset origini, ei ole tehtud.



Joonis 4. Skemaatiline URR-i ülesehitus. Näidatud on L1 lugemisraami lõpp ning E6 lugemisraami algus. Näidatud on E1, E2 valgu ja erinevate transkriptsioonifaktorite seondumiskohad. A- alfabapilloomiviiruse URR-i ülesehitus. B- betapapilloomiviiruse URR-i ülesehitus ().

6. DNA kahjustuse vastus ning viiruse genoomi oligomeriseerumine

DNA kahjustused tekivad organismis igapäevaselt nii eksogeensete faktorite nagu UV-kiirgus ja keemilised ühendid kui ka endogeensete faktorite mõjul (Oberle and Blattner, 2010). Endogeenseteks faktoriteks on raku elutegevuse tulemusel tekkinud reaktiivsed ühendid ja replikatsiooni stress. Kahjustuse tekkimisel käivitatakse DNA kahjustuse vastus (DDR), mille käigus tuntakse ära DNA ahela katke, peatatakse rakutsükkel ning rakulised reparatsioonisüsteemid üritavad tekkinud viga parandada. Kui tekkinud kahjustust ei suudeta parandada suunatakse rakk apoptoosi (Sancar et al., 2004). Kahjustustest kõige ohtlikumad on kahe- ahelalised DNA katked, mille parandamiseks on olemas kaks moodust: homoloogiline rekombinatsioon (HR) ning mittehologiline otste ühendamine (NHEJ) (Llorente et al., 2008). Mittehologiline otste ühendamine on valdav reparatsioonimehhanism rakutsükli jooksul, kuid kõige rohkem leiab see kasutamist G1 faasis. NHEJ käigus ühendab reparatsioonikompleks katkenud DNA ahelad ning tõenäosus deletsioonide tekkeks on suur (Lieber, 2010), seetõttu on NHEJ vigaderohke parandussüsteem. Homoloogne

rekombinatsioon on võimalik vaid jaguneva raku S ja varajases G2 faasis, kui õdekromatiidid on üksteisele füüsiliselt lähedal. HR-i puhul taastatakse vigastatud koht ilma mutatsioonideta, sest kahjustatud piirkonna uuestisünteesimiseks kasutatakse matriitsina homoloogilist õdekromatiidi (Lieber, 2010; Mladenov et al., 2013). HR-i käigus tekivad Holliday ühendused, mille lahti lõikamisel võivad tekkida rekombinantset DNA ahelad.

Paljud viirused suudavad tekitada peremeesorganismis DNA kahjustuse vastuse tekitades replikatsioonis intermediaate, mida rakulised süsteemid tunnevad ära DNA kahe ahelise katkena. Viirused suudavad käivitada DDR-i ja interakteeruda rakuliste reparatsiooni süsteemidega selleks, et kaitsta viiruse genoomi lagundamise eest või kohandada rakulist keskkonda viiruse replikatsiooni soodustavaks (Weitzman et al., 2010). Seda näiteks juhul kui viiruse replikatsioon on sõltuv peremeesraku replikatsioonivalkudest nagu näiteks herpes-simplex viirus 1 puhul (HSV-1) (Lilley et al., 2005). Epstein-Barri viirus aktiveerib DDR-i oma lüütilise eluetapi replikatsioonis, kus sünteesitud viiruslik DNA põhjustab DNA kahjustuse vastuse, edasist signaalrada modifitseeritakse aga viisil, kus lõppkokkuvõttes tekitatakse rakutsükli S faasile sarnane keskkond, kus raku genoomne DNA replikatsioon on juba lõppenud, kuid kõik vajalikud replikatsioonivalgud on veel olemas. (Kudoh et al., 2005). Seega soodustatakse viiruse replikatsiooni.

Papilloomiviiruse puhul on näidatud, et DNA kahjustuse vastuse aktiveerimine viiruse replikatsioonitsentrites ja sellega kaasnev rakutsükli peatumine S või G2 faasis diferentseeruvates keratinotsüütides on üldine mehhanism ning kontrollitud E1 valgu taseme poolt (Fradet-Turcotte et al., 2010; Kadaja et al., 2009).

HPV viiruse füüsilist olekut peremeesrakus on uuritud palju seoses teadmisega, et tihtilugu on vähirakkudes kõrgeriski papilloomiviiruste genoom või selle subgenoomne fragment integreerunud peremeesraku genoomi (Cullen et al., 1991). Samuti on näidatud, et rakus replitseerudes omandab viirus lisaks monomeersele vormile ka multimeersed vormid. Ka patsientidelt võetud proovid näitavad, et paljudel juhtudel on HPV episoom infektsiooni käigus läinud üle multimeerseks vormiks (Kalantari et al., 2001), mis annab alust arvata, et viirusgenoomi oligomeriseerumine on tavaline looduses aset leidv protsess. Multimeeri puhul on ühinenud mitu 8kb suurust viiruse genoomi ning tundub, et millegi pärast on multimeerne genoom pikaajalise infektsiooni käigus eelistatud seisukorras, sest senised analüüsid näitavad ajas kõrgemate vormide osakaalu suurenemist (Marit Orav, avaldamata andmed). Arvatakse, et oligomeerid tekivad homoloogse rekombinatsiooni tulemusel

Holliday ühenduste kaudu DNA kahjustuse vastuse aktiveerimisel (Marit Orav, avaldamata andmed).

7. U2OS mudelsüsteem

Papilloomiviiruste elutsükel on tugevalt seotud keratinotsüütide diferentseerumisega ning kuigi paljud papilloomiviiruse tüved isoleeriti enam kui 30 aastat tagasi, on nende uurimine olnud piiratud sobiva mudelsüsteemi puudumise tõttu. Epiteeli mitmekihilist ehitust matkivad parvkultuurid ja immunpuudulikke hiiri rakendavad ksenograafid on osutunud ääretult kasulikuks kõrgeriski alfabapilloomiviiruste patogeensuse uurimisel, kuid senini ei ole õnnestunud luua mudelsüsteemi uurimaks nahka nakatavate papilloomiviiruste replikatsiooni. U2OS rakuliin pärineb sääreluu mõõdukalt diferentseerunud epiteeli osteosarkoomist ja on osutunud sobivaks mudelsüsteemiks nii kõrge kui madalariski alfa- ja betapapilloomiviiruste uurimisel (Geimanen et al., 2011) U2OS rakuliinil on kinnituva epiteeli morfoloogia ja see rakuliin toetab kõrgeriski alfabapilloomiviiruste transientset, stabiilset ning vegetatiivset amplifikatsiooni, mis lubab uurida viiruse kõiki kolme replikatsioonifaasi ning üleminekuid ühest faasist teise. Transkriptoomi uuringud on näidanud, et U2OS rakkudes nii HPV5, HPV11 kui HPV18 transkriptid vastavad suures osas patsientide nakatatud kudedest eraldatud ja sekveneeritud transkriptidele (Eve Sankovski, avaldamata andmed; Andres Männik, avaldamata andmed; Isok-Paas, avaldamata andmed). See näitab, et U2OS rakkudes on võimalik uurida neid mehhanisme, mis toimivad viiruse loomuliku nakkuse puhul keratinotsüütides. Konfuletselt kasvatatud U2OS rakud ekspresseerivad ka diferentseerunud keratinotsüütidele iseloomulikku tsütokeratiin 10-t. Betapapilloomiviiruste replikatsiooni puhul on siiski näidatud, et U2OS mudelsüsteem on sobiv uurimaks transientset ja stabiilset replikatsiooni, kuid viirus ei ole neis rakkudes suuteline sisenema hilisesse amplifikatsiooni staadiumisse nagu on näidatud HPV18 puhul (Geimanen et al., 2011). Selle põhjuseks võib olla betapapilloomiviiruste amplifikatsiooniks vajalike transkriptsioonifaktorite puudumine U2OS rakkudes, mis veelgi näitab alfa- ja betapapilloomiviiruste erinevust. Siiski omab U2OS rakuliin, kui ainus beetapapilloomiviiruse transientset ja stabiilset replikatsiooni toetav mudelsüsteem suurt tähtsust.

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Töö eesmärgid

HPV erinevaid elutsükleid on olnud raske uurida, sest viiruse elutsüklil on tihedas sõltuvuses keratinotsüütide diferentseerumisest. Sarnaseid tingimusi *in vitro* on luua keeruline. Alfapapilloomiviiruste replikatsiooni uurimist võimaldavad erinevaid naha kihte jäljendavad parv kultuurid, kuid beetapapilloomiviirused ei ole võimelised neis replitseerima. Enamik mono kihis kasvavaid rakukultuure aga ei toeta HPV replikatsiooni. Seeõttu on beetapapilloomiviiruste replikatsiooni uurimine olnud piiratud.

Tartu Ülikooli papilloomiviiruste uurimise töörühmas töötati välja U2OS rakuliinil põhinev mudelsüsteem, milles replitseeruvad edukalt nii transientses kui stabiilses faasis alfa- ja beetapapilloomiviirused. Seni on näidatud, et ka beetapapilloomiviiruse replikatsiooni jaoks on vajalikud viiruse E1 ja E2 valgud (Eve Sankovski, avaldamata andmed), kuid täpsema replikatsiooni mehhanismi kohta on vähe teada. Sellest tulenevalt on minu töö eesmärkideks:

- 1) Beetapapilloomiviiruste transientse replikatsioonimehhanismi ja tekkivate intermediaatide uurimine HPV5 näitel.
- 2) Beetapapilloomiviiruse replikatsiooniks minimaalse cis- regiooni tuvastamine
 - a) HPV5 minimaalsete originikonstruktide disain ja konstrueerimine
 - b) HPV5 E1 ekspressioonivektori konstrueerimine
 - c) HPV5 E1 ekspressiooni kontrollimine U2OS rakkudes
 - d) minimaalsete originikonstruktide replikatsiooni kontrollimine U2OS rakkudes

2. Materjal ja metoodika

2.1. Plasmiidid

2.1.1 Kasutatud plasmiidid:

1) **HPV5 *mc*** 8 kb suurune kovalentselt suletud superspiraliseerunud HPV5 genoom. Sarnaneb loodusesesinevaga, kuid sisaldab lühikest lisajärjestust L1 avatud lugemisraami järel (Kay et al., 2010).

2) **HPV5-pMC.BESPX** 12 kb pikkune konstrukt, mis sisaldab HPV5 genoomi kloonituna pMC.BESPX algvektorisse multikloneerimissaiti. Vektor sisaldab veel algvektorist pärit kanamütsiini resistentsusgeeni, restriктаas *Sce-I* lõikekohti ja bakteriofaag Φ C31 integraasi äratundmisjärjestusi *attB* ja *attP*.

3) **pUC18** 2686 bp pikkune kloonimisvektor, kus on ampitsilliini resistentsusgeen, β -galaktosidaasi geen ning multi kloonimissait (MCS).

4) **pQM-Ntag/Ai** vektor, mis sisaldab SV40 replikatsiooni alguspiirkonda, ampitsilliini resistentsusgeeni, tsütomegaloviirus (CMV) promooterit, β -globiini intronit. (Quatromed).

5) **HPV8E1pQMN-Tag/Ai** HPV8 E1 ekspressioonivektor, milles HPV8 E1 lugemisraami järjestus on viidud pQMNTag/Ai vektorisse CMV promooteri kontrolli alla. E6 ja E7 valkude startkoodon on muteeritud. Lisaks on lugemisraami algusesse viidud gripiviiruse hemaglutiniini märgis (HA-tag). (Konstrueeris Airiin Laaneväli)

6) **HPV5E2pQM-NTAi** HPV5 E2 ekspressioonivektor, milles HPV5 E2 lugemisraam on viidud pQM-NTag/Ai vektorisse. (Konstrueeris Airiin Laaneväli)

2.1.2 Konstrueeritud plasmiidid:

1) **pUC18-URR** (edaspidi täispikk URR) HPV5 täispikk URR järjestus (nukleotiidid 7467-199 HPV5 genoomis) kloonituna pUC-18 multikloneerimissaiti restriктаasidega *XbaI* ja *EcoRI*. Järjestus amplifitseeriti HPV5 *mc* plasmiidilt PCR-i abil praimeritega PrHPV5URRXbaI_F ja PrHPV5URREcoRI_R. (Praimerite järjestused on toodud välja Lisas 1.)

2) **pUC18-URRI** HPV5 URR-i fragment (nukleotiidid 7467-23) kloonituna pUC-18 multikloneerimissaiti restriктаasidega *XbaI* ja *EcoRI*. Järjestus amplifitseeriti PCR-i praimeritega PrHPV5URRXbaI_F ja PrHPV5URRIEcoRI_R.

3) pUC18-URRII HPV5 URR-i fragment (nukleotiidid 8-199) kloneerituna pUC-18 multikloneerimissaiti restriktasidena *XbaI* ja *EcoRI*. Järjestus amplifitseeriti praimeritega PrHPV5URRIIXbaI_F ja PrHPV5URREcoRI.

4) pUC18-URRIII HPV5 URR-i fragment (nukleotiidid 8-133) kloneerituna pUC-18 multikloneerimissaiti restriktasidena *XbaI* ja *EcoRI*. Järjestus amplifitseeriti PCR-i praimeritega PrHPV5URRII_F ja PrHPV5URRIII_R .

5) pUC18-URRIV Kahest komplementaarsest DNA oligonukleotiidist järjestusest kokku sulatatud 58 bp pikkune HPV5 URR-i fragment (nukleotiidid 7738-48) kloneerituna pUC-18 multikloneerimissaiti.

6) pUC18-URRV Kahest komplementaarsest DNA oligonukleotiidist järjestusest kokku sulatatud 65 bp pikkune HPV5 URR-i fragment (nukleotiidid 20-85) kloneerituna pUC-18 multikloneerimissaiti.

7) HPV5E1pQMN-Tag/Ai HPV5 E1 ekspressioonivektor, milles on HPV5 E1 lugemisraami järjestus on viidud pQMN-Tag/Ai vektorisse CMV promooteri kontrolli alla. (Lisa 3). Mutatsioonide tegemiseks kasutati DNA sünteesi (Genewiz). Sünteesitud 1088 bp pikkune DNA (nukleotiidid 201-1251) sisaldas rikutud E6 ja E7 lugemisraame, kus ATG koodon oli muudetud ACG-ks. E1 lugemisraami on pärast neljandat aminohapet viidud sisse HA-tag, et tuvastada valku hiljem *Western blotil*. Teine pool E1 lugemisraamist (nukleotiidid 961-2781) amplifitseeriti PCR-i abil praimeritega HPV5E1XbaF ja HPV5E1_R 211. Kloneerimise sooritati kahe etapiliselt. Alguses lõigati PCR-i produkt ja vektor ensüümidega *XbaI* ja *XmaI* ning ligeeriti. Seejärel lõigati tekkinud konstrukti ja sünteetilist DNA-d ensüümidega *BoxI* ja *XmaI* ning ligeeriti.

2.2. Kloneerimine

Erinevad kloneerimise etapid teostati kasutades firma *Thermo Scientific* ensüüme ja puhvreid. Kõik restriksioonid teostati 37° C juures vähemalt tunni aja jooksul. Reaktsiooniks sobiv puhver valiti vastavalt Thermo Scientific protokollide soovitudele, milles oli ensüümi efektiivsuseks puhvris märgitud vähemalt 50-100%. Pärast ensüümidega lõikamist restriksiooniprodukt puhastati *Nucloespin DNA Purification Kit*-iga (*Macherey Nagel*). Vektorit töödeldi vajadusel ensüümiga FastAP, mis eemaldab 5' fosfaatrühmad ning takistab vektori iseligeerumist. Restriksioonfragmentid puhastati TAE puhvriga (0,04 M Tris-atsetaat, 0,001 M EDTA) valmistatud 0,8% agarosgeelist *Nucloespin DNA Purification Kit*-iga (*Macherey Nagel*). Sünteetiliste DNA järjestuste kokkusulutamiseks (*annealimiseks*)

segati komplementaarsed oligonukleotiidid võrdses molaarses vahekorras ning lahjendati veega kuni kontsentratsioonini 100 pmol/ μ l, 50 mM NaCl (pH 8.0) juuresolekul. Seejärel inkubeeriti oligonukleotiide 30 sekundit 100°C juures ja lasti kuumablokil jahtuda toatemperatuurini. Saadud fragmendid puhastati 0,8% agarosgeelist TAE (0,04 M Tris-atsetaat, 0,001 M EDTA) puhvris. DNA ligeeriti T4 ligaasiga (kasutades T4 ligaaspuhvrit) 22°C juures 1 tund kuni üleöö. Vektori ja inserdi ligeerimisel jälgiti kontsentratsiooni suhet 1:3. Saadud konstruktide paljundamiseks kasutati bakteri *E.coli* tüve DH5 α . Plasmiidid transformeeriti bakterisse kuumaehmatuse meetodil 42°C juures 90 sekundit ning seejärel kasvatati 12-16 tundi LB söötme Amp selektiivtassidel 37°C juures. Valitud kolooniad külvati LB vedelsöötmesse, kuhu oli lisatud ampitsiliini lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml ning kasvatati 37°C 220rpm juures 12-14h. Plasmiidid puhastati *FavorPrep TM Plasmid Extraction Mini Kit*iga (*Favorgen Biotech Corp.*) vastavalt toodud protokollile.

2.3 HPV5 mc genoomi produktsioon

HPV5 genoomi sisaldav pMC.BESPX plasmiid transformeeriti *Eschericia coli* tüve ZYCY10P3S2T kompetentsetesse rakkudesse kuumaehmatuse meetodil (90 sek 42°C juures). Baktereid kasvatati 30 minutit LB vedelsöötmes ja plaaditi Km selektiivstassile, kolooniaid kasvatati 12-16h 37°C juures. Õhtul pandi bakterikoloonia kasvama 10 ml LB söötmesse, kuhu lisati kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 μ g/ml. Kolooniat kasvatati 37°C 220 rpm juures. Järgmise päeva hommikul inokuleeriti 5 ml starterkultuuriga 100 ml TB (*Terrific Broth*) söödet (Invitrogen), kuhu lisati kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 μ g/ml. Starterit kasvatati 37°C ja 220 rpm-i juures seni, kuni bakterisuspensiooni optiline tihedus (OD) 600nm juures saavutas taseme 4 ühikut. Seejärel lisati mc induksiooni lahus (100 ml LB söödet, 4% NaOH, 0,04% L-arabinoosi). HPV5 mc plasmidi produktsioon toimus 32°C 220 rpm juures 5-6 tundi. Sel ajal toimub kohtspetsiifilise rekombinatsiooni ning algvektori pMC.BESPX katki lõikamine. Rekombinatsiooni tulemusel tekib tsirkulaarne superspiraliseerunud HPV molekul, mis sisaldab lühikest lisajärjestust L1 lugemisraamis. 6 h pärast tsentrifuugiti (4°C 5000 g juures 15 minutit) bakterimass põhja ning bakterirakkudest eraldati plasmiidne DNA *NucleoBond PC 500 EF kit*- abil (*Machery-Nagel*).

2.4. Rakuliinid

Töös kasutati U2OS rakke, mida kasvatati 100 mm läbimõõduga koekultuuri plaatidel kasutades IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söödet (PAA), kuhu oli lisatud 10% mahus veise loote seerumit (PAA), 100 IU/ml penitsilliini ja 100 ng/ml streptomütsiini (PAA). Tasse kultiveeriti 37°C juures 5% CO₂ sisaldusega termostaadis.

2.5. Eukarüootsete rakkude transfektsioon elektroporatsiooni meetodil

Transfektsiooniks kasutati rakke, mis olid kasvanud 80-90%-lise konfluentsuseni. Üheks transfektsiooniks kasutati ühe 100 mm koekultuuri tassi jagu rakke. Tassidelt aspireeriti sööde ning pesti kaks korda 2ml 1x PBS lahusega (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄). Rakud eemaldati tassilt lisades 2 ml 0,25% trüpsiinilahust ning koguti kokku 50 ml tuubi, mis sisaldas 25 ml söödet. Tuube tsentrifuugiti 5 minutit 200 g juures. Seejärel eemaldati sööde ja rakud resuspendeeriti 250 µl söötmes/poratsiooni kohta ning lisati 5mM NaBes puhvrit ja 30 µg kandja (*carrier*) DNA-d, milleks kasutati lõhe sperma DNA-d. Rakususpensioon pipeteeriti küvetti, kuhu lisati uuritav plasmiidne DNA. Rakud transfekteeeriti pingel 220 V 975 µF mahutavuse juures, kasutades Bio-Rad *Gene Pulser Xcell* aparati. Pärast elektroporatsiooni kanti rakud küvetist 15 ml tuubi, kuhu oli eelnevalt pipeteeritud 8 ml söödet. Rakud koguti tsentrifuugimisega 5 min 200g, sööde aspireeriti. Rakud resuspendeeriti söötmes ning seejärel kanti 100mm läbimõõduga koekultuuri tassile.

2.6. Madalmolekulaarse DNA eraldamine eukarüootsetest rakkudest Hirt lüüsi meetodil

Tassidelt eemaldati sööde ning pesti 2 ml 1xPBS-iga, PBS-i jäägid eemaldati aspireerides. Tassile lisati 800 µl Hirt lüüsilahust (0.5% SDS, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA) ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril aeg-ajalt tasse kallutades. Tilkhaaval lisati 200 µl 5 M NaCl lahust, tasse aeg- ajalt kallutades. 2D analüüsiks kasutatavale materjalile lisati koos 5 M NaCl-ga 100 µl 2% CTAB lahust (100mM Tris-Cl, 20mM EDTA, 1,4 M NaCl), mis stabiliseerib replikatsioonistruktuure. Lüsaat koguti spaatliga tuubidesse ning hoiti üleöö +4°C juures. Lüsaati tsentrifuugiti 15 minutit 16 000 g 4°C juures. Supernatant pipeteeriti uude tuubi ning DNA sadestati 600ul isopropanooliga -20°C juures vähemalt 30 minuti jooksul. Tuube tsentrifuugiti 15 minutit 16 000 g 4°C juures ning

supernatant eemaldati. Sade resuspendeeriti 200 µl Sol IV-s (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.2% SDS), kuhu oli lisatud proteinaas K-d lõpp-kontsentratsiooniga 0.2 µg/ml. Proove inkubeeriti 1,5h 37°C juures. Proovidele lisati võrdne maht fenool-kloroform segu (1:1) ning segati vorteksil. Tuube tsentrifuugiti 4 minutit 16 000 g juures ja ülemine vesifaas tõsteti uude tuubi. DNA sadestati kahekordse mahu 96% etanooliga -20°C juures vähemalt pool tundi. Tuube tsentrifuugiti 10 minutit 16 000 g 4°C juures, supernatant eemaldati ning sadet pesti 70% etanooliga. Tsentrifuugiti 5 minutit 16 000 g juures, supernatant eemaldati ja sade kuivatati. Sade resuspendeeriti 20 µl TE-s, mis sisaldas 20 µg/ml RNAas A-d. Proove inkubeeriti 1 tund 37°C juures ning lõigati üleöö lineariseeriva ensüümiga. Tranfekteeritud ja replitseeritud DNA eristamiseks restrikteeriti proove ensüümiga DpnI, mis lõikab bakteriaalselt metüleeritud sisseviidud DNA-d.

2.7. Southern blot analüüs

DNA lahutati geelelektroforeesil 0.8% (2D analüüsi puhul 0,4% geelis) agarosgeelis 1xTAE (0,04 M Tris-atsetaat, 0,001 M EDTA) puhvris. Geel denatureeriti loksutades geeli 30 minutit lahuses Sol A (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), seejärel neutraliseeriti loksutades 15 minutit lahuses Sol B (1 M Tris pG 7.4, 1.5 M NaCl). DNA ülekande *Hybond-N+* filtrile (Amersham Pharmacia Biotech) toimus kapillaarse ülekande meetodil 10x SSC puhvris (1.5 M NaCl, 150 mM Na₃C₆H₅O₇) 12-18 tunni jooksul. DNA seoti filtrile *UV Stratalinker 1800* aparaadiga (*Stratagene*). Ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks töödeldi filtrit enne hübridiseerimist vähemalt 1h jooksul 65°C juures prehübridisatsiooni lahusega (20x SSC, 50x Denhart, 10% SDS, denatureeritud kandja DNA 200 µg/ml). Hübridisatsiooniproovina kasutati lineariseeritud HPV5 genoomsi või minimaalse origini leidmise puhul HPV5 URR-i fragmenti, mis märgistati *DecaLabel TM DNA Labeling Kit*-i (Thermo Scientific) ja radioaktiivset α³²P-dCTP-d kasutades (*“Du Pont NEN”*). Hübridisatsioon kestis vähemalt 18h 65°C juures. Pärast hübridisatsiooni pesti filtrit 3 korda 5 minutit pesulahusega I (2xSSC, 0.1% SDS) ja 2 korda 15 minutit pesulahusega II (1xSSC, 0.1% SDS) ja 2 korda pesulahusega III (0,2x SSC, 0,1%SDS) Signaal detekteeriti eksponeerides filtrit röntgenfilmile (FUJI).

2.8. 2D geelelektroforees

Uuritavad proovid lahutati 1D foreesil 0.4% agarosgeelis 1xTAE puhvris ilma etiidiumbromiidita 72 tunni jooksul rakendades pinget 0.4 V/cm. Teises dimensioonis lahutamise jaoks lõigati proovi sisaldav geeliriba 1D geelist välja, keerati 90° vastupäeva ning selle ümber valati 1% etiidiumbromiidi (0.3µg/ml) sisaldav agarosgeel. 2D forees toimus 1xTAE puhvris, kuhu oli lisatud etiidiumbromiidi lõpp-kontsentratsiooniga 0.3µg/ml, rakendades pinget 5.5 V/cm 4 tunni jooksul temperatuuril 4°C.

2.9. Western blot analüüs

48 ja 72 h kasvanud 100 mm koekultuuri tassidelt eemaldati sööde ning rakke pesti 2 korda 1xPBS-iga. Rakud lüüsi, kasutades 2x Laemmli puhvrit (100mM Tris-HCl pH 6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 0,2% broomfenoolsinine, 20% glütserool) uurimaks valkude ekspressiooni ekspressioonivektorilt. Lüsaat koguti kokku ja kanti 1,5 ml tuubi. Seejärel kuumutati proove 100°C juures 10 minutit. Valgud lahutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis 1xSDS jooksupuhvris (125mM Tris, 0,96M glütsiin, 0,5% SDS) pingel 80V. Geeli loksutati 15 minutit *SemiDry* puhvris (48mM Tris, 39mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool). PVDF (*Millipore Immobilon*)- filter märjati metanoolis ja loksutati 10 minutit *SemiDry* puhvris. *BIO-RAD Trans-blot SD* aparaadiga tehti ülekanne kasutades pinget 15V 30 minutit. Filter blokeeriti 1 tunni jooksul 5% lõssilahuses 1xPBS puhvris, kuhu oli lisatud 0,1% Tween20. Seejärel inkubeeriti filtrit 1 tund 5% lõssilahuses 1xPBS-0,1%Tween20-s, kuhu lisati HA-tag-i vastast 3F10-HRP antikeha (*Roche*) lahjendusega 1:200. Seejärel pesti membraani 3 korda 5 minutit ja 2x7 minutit pesulahusega (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,1% Tween20) ning detekteeriti signaal, kasutades Kit'i *Amersham Pharmacia Biotech ECL TM* ning seejärel eksponeeriti *Fuji Medical X-ray* filmile toatemperatuuril.

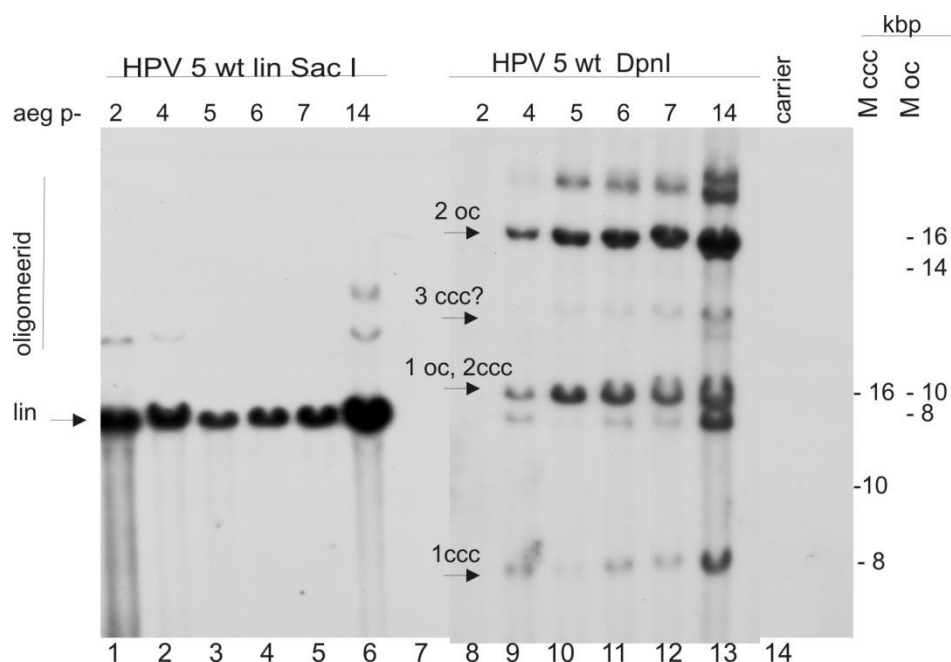
TULEMUSED JA ARUTELU

3. Betapapilloomiviiruste transientse replikatsiooni mehhanismi ja tekkivate intermediaatide uurimine HPV5 näitel.

Meie laboris on tõestatud, et U2OS rakuliin on võimeline toetama betapapilloomiviiruste HPV5, HPV8 ja HPV38 genoomi algset lühiajalist replikatsiooni (Geimanen et al., 2011). Samuti on näidatud HPV5 replikatsiooni sõltuvus E1 ja E2 valgust (Eve Sankovski, avaldamata andmed). Täpsemad teadmised aga replikatsiooni mehhanismi, intermediaatide ja produktide kohta puuduvad. Kõik katsed on läbi viidud kasutades HPV5 superspiraliseerunud genoomi, mis sarnaneb looduses esinevaga ning saadud kasutades bakteriaalset rekombinatsiooni mehhanismi (Kay et al., 2010).

3.1. HPV5 genoomi esialgsel amplifikatsioonil tekivad multimeerid

On näidatud, et rakus replitseerudes omandab viirus lisaks monomeersele vormile ka multimeerseid vorme. Seda tõestavad ka patsientidelt võetud proovid (Kalantari et al., 2001). Kuna see tundub olevat looduses tavaline protsess, siis mu esimese katse eesmärk oli vaadelda HPV5 esialgset amplifikatsiooni ja selle käigus tekkivate replikatsiooniproduktide olekut ning käitumist ajas. Katseks transfekeeriti 1 µg HPV5 genoomi U2OS rakkudesse ning 2, 4, 5, 6, 7 ja 14 päeva möödudes eraldati madalmolekulaarne DNA Hirt lüüsi meetodil. Igast DNA proovist pool lineariseeriti restriktasaasiga SacI ning teist poolt proovist töödeldi restriktasaasiga DpnI, mis lõikab katki vaid bakteriaalse metülatsioonimustriga DNA ning jätab puutumata eukarüootses rakus juurde replitseerunud DNA. Tulemused on toodud Joonisel 6.



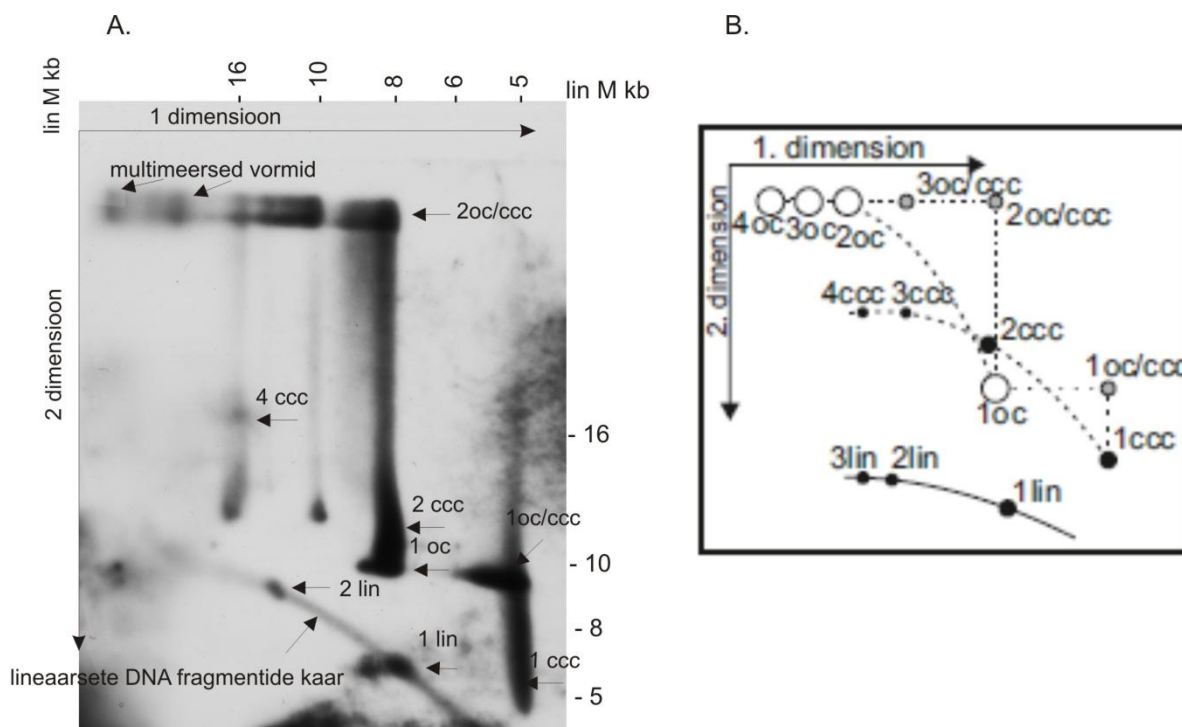
Joonis 6. HPV5 replikatsiooniproduktide jälgimine U2OS rakuliinis ühedimensionaalsel (1D) elektroforeesil. U2OS rakke transfekeeriti 1 µg HPV5 genoomiga 30 µg kandja DNA ning 5mM NaBes puhvri juuresolekul. 2, 4, 5, 6, 7 ja 14 päeva möödudes lüüsi rakud ning eraldati madalmolekulaarne DNA (Hirt lüüsi meetod), mida analüüsiti Southern blot meetodil, kasutades hübridisatsiooniproovina HPV5 lineariseeritud genoomi. Iga ajapunkti pool eraldatud DNA-st restrikteeriti HPV5 genoomi lineariseeriva ensüümiga SacI (rajad 1-6). Teist poolt proovist töödeldi restriктаasiga DpnI (rajad 8-13). Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult kandja DNA-ga (carrier, rada 14) transfekeeritud U2OS rakke. Markeritena on kasutatud Naxo 1kb DNA ladderit ning Sigma Aldrich super coiled ladderit ja lineaarseeritud genoomi.

Lineariseeritud proovide (read 1-6) puhul on näha ainult viiruse genoomi summaarset osakaalu proovis, kuna kõik viiruse genoomi episoomid konverteeritakse lineaarseteks monomeerseteks molekulideks, mis annavad analüüsil ühise signaali (joonisel märgitud tähisega lin). Esimese kahe ajapunkti (read 1 ja 2) tugevam signaal on põhjustatud sisseporeeritud DNA olemasolust, lineaarsest signaalist kõrgemal asuvad signaalid kuuluvad aga HPV5 mc genoomi paljundamisel tekkinud rekombineerumata algplasmiidile. Hilisemates ajapunktides näeme ainult eukarüootses rakus replitseerunud DNA-d. Vaatamata algse sisseporeeritud DNA olemasolule esimestes proovides on näha aja jooksul replikatsiooni signaali tugevnemist, sest viirusega nakatatud rakkude arv kasvab. Viirusega transfekeeritud U2OS rakkudes säilis viiruse genoom mitteselektiivsetes tingimustes ka 14 päeva pärast transfektsiooni (rida 14), mis tõestab U2OS rakkude sobivust betapapilloomiviiruste uurimiseks. Viirusega nakatatud U2OS rakud ei näidanud erinevusi kasvukiiruses ega morfoloogias võrreldes tavalise U2OS rakuliiniga. See on kooskõlas

varasemalt avaldatud andmetega (Geimanen et al., 2011) ja näitab, et U2OS rakuliin pakub sobivat keskkonda viiruse genoomi episoomi säilimisele ja replikatsioonile. Real number 6 olevad lisasignaaliid ei kuulu enam algplasmiidile HPV5-pMC.BESPX, kuna vahepealsetes (rida 5-7) ajapunktides see signaal puudub. Seega peavad antud signaalid olema viiruse genoomi replikatsiooni vaheproduktid, mis on resistentsed SacI ensüümi lõikamisele.

Lineariseeritud DNA puhul ei ole näha viiruse genoomi erinevad topoloogiad rakus, sest kõik tekkivad vormid lõigatakse 8 kb suuruseks lineaarseks vormiks. Erinevaid episoomide monomeerseid ja multimeerseid vorme saab uurida lõikamata DNA analüüsil (Joonis 6, read 8-13). Monomeersed HPV genoomi 3 vormi, mis liiguvad foreesil geelis erineva kiirusega, hõlmavad enda alla 8 kb suuruseid kovalentselt suletud tsirkulaarseid molekule (1 *ccc*- covalently closed circular), mis on lähedased loodulikult esineva viiruse genoomi konformatsiooniga, 8 kb suuruseid avatud tsirkulaarseid molekule (1 *oc*- open circular), mille puhul on DNA ühes ahelas katke ning lineaarseid molekule (1 *lin*), mida alati esineb teatud määral ka lõikamata DNA puhul. Monomeersed vormid suudavad multimeriseeruda ning tekitada di- ja trimeerseid vorme, mille puhul mitu 8 kb suurust genoomi on ühendatud. Kõikidele erinevatele vormide asukohale on joonisel 6 viidatud noolega. Katsest selgub, et aja jooksul tekib suuremaid vorme juurde ning lisaks 16 kb suurusele 2_{oc} molekulile lisandub veel kõrgemaid vorme, mille suuruse hindamist antud analüüs ei võimalda. Samuti on võimalik näha vorme, mis jooksevad 12 kb *oc* molekulide kõrgusel ning võivad vastata 3_{ccc} konformatsioonile, kuid kasutatud suurusmarkerid ei võimalda nende suurust täpselt hinnata. Lisaks on huvitav, et kuigi HPV18 puhul on näidatud (Orav, avaldamata andmed) monomeerse vormi ülekaalu varastes ajapunktides, avaldub HPV5 puhul multimeeri suurem osakaal läbi terve katse. Isegi 4 päevase ajapunkti juures (rida 9) on rohkem viiruslikku DNA-d dimeerses vormis kui monomeerses. Praeguseks pole veel selge, miks viiruse genoomi oligomeriseerumine toimub, kuid on võimalik, et multimeerses vormis on aktiivne vaid üks replikatsiooni origin ning see võimaldab ühe replikatsiooni initsiatsiooniga paljundada mitu koopiat viiruslikku genoomi. See annaks multimeersetele genoomidele olulise eelise viirusinfektsiooni latentses faasis, kus viiruse replikatsioonivalkude madala taseme juures on vaja säilitada küllaltki kõrget genoomset koopiaarvu. Kuna betapapilloomiviirused on madalama replikatsioonitasemega kui alfapapilloomiviirused, siis neile võib olla veelgi vajalikum hoida oma genoomi multimeerses olekus.

Ühedimensionaalne geelelektroforees võimaldab oligomeeride uurimist piirangutega, sest sõltuvalt kasutatud geeli protsendist, võib olla olukord, kus näiteks 2 ccc ja 1 oc vorm ning 4 ccc ja 2 oc vorm lahutuvad ühel kõrgusel ning neid eristada on küllaltki keeruline. Uurimaks lähemalt HPV5 genoomse materjali staatust U2OS rakkudes, analüüsiti HPV5 topoloogiat 2D neutraalne-neutraalne geelelektroforeesi meetodil. Selleks transfekteeriti 3 µg HPV5 genoomi U2OS rakkudesse ja pärast 5 päeva möödumist eraldati madalmolekulaarne DNA Hirt lüüsi meetodil. Üheks analüüsiks kasutati kahe 100mm läbimõõduga koekultuuri tassi jagu rakke. Lõikamata DNA lahutati 2D geelelektroforeesil. 2D foreesi puhul toimub DNA fragmentide lahutamine esimeses dimensioonis lahjas agarosgeelis (0,4%) ilma etiidiumbromiidita ning teises dimensioonis kanges agarosgeelis (1%) etiidiumbromiidi juuresolekul. Esimestel tingimustel toimub molekulide lahutamine suuruse järgi ning seejärel teises dimensioonis peamiselt kuju järgi (Schvartzman et al., 2012). Lisaks annab 2D analüüs võimaluse kinnitada oligomeersete vormide olekut ekstrakromosomaalsete episomaalsete molekulidena. Nahapapilloomiviiruste puhul ei ole täheldatud viiruse genoomse materjali integratsiooni peremeesraku genoomi, kuid kõrgeriski limaskestade HPV-de puhul on tegemist tavapärase nähtusega. Ühedimensionaalne analüüs ei võimalda eristada integreerunud viiruslikku DNA-d multimeersetest episoomidest, kuid 2D geelelektroforeesid on selleks võimelised, sest eristavad rõngasmolekule lineaarsetest molekulidest ning kromosoomi integreerunud DNA on ainult lineaarne. Joonisel 7A näha olevaid erinevaid DNA vorme aitab selgitada joonis 7B, mis kujutab erinevate episomaalsete vormide liikumist 2D agarosgeelil (Marit Orav, avaldamata andmete kogust).



Joonis 7. (A) U2OS rakkudest eraldatud HPV5 episomaalse DNA analüüs 2D geelelektroforeesil. U2OS rakke transfecteeriti 3 µg HPV5 DNA-ga ja kandja DNA-ga. Pärast 5 päeva möödumist transfectsioonist eraldati Hirt lüüsi meetodil madalmolekulaarne DNA, mis lahutati lõikamata kujul 2D geelelektroforeesil. Analüüsis kasutati kahe 100 mm läbimõõduga koekultuuritassi jagu rakke. HPV5 füüsilise oleku analüüsimiseks kasutati *Southern blot* meetodit ning hübridiseerimiseks HPV5 täispikka genoomi. Joonisel olevad nooled näitavad multimeersete vormide, erinevate ccc ja oc vormide asukohti. (B) Skemaatiline ülevaade erinevates konformatsioonides olevate episoomide liikumisest 2D elektroforeesil.

2D geelelektroforeesil läbi viidud HPV5 genoomi konformatsiooni analüüsil näeme paremini episoomi esinemist erinevates vormides. Monomeersetest vormidest on esindatud nii superspiraliseerunud (1 ccc), avatud tsirkulaarne (1 oc) kui lineaarne olek (1 lin), millest ükski ei ole domineeriv. Näha on suurte avatud konformatsioonis olevate multimeeride esinemine, kuid nende suurust on raske määratleda, sest molekuli suuruse tõttu ei lahutu nad geelis hästi. Rohkelt on näha erinevate avatud tsirkulaarsete/ superspiraliseerunud (oc/coc) vahevormide esinemist, kus esimeses dimensioonis on molekul jooksnud kui ccc vorm ning teises kui avatud tsirkulaarne vorm. See võib olla tingitud konformatsiooni lagunemisest teise dimensiooni ajal. Jooniselt on näha ka 3ccc ja 4ccc vormi esinemine, millest viimane jookseb ühedimensionaalsel elektroforeesil samal kõrgusel 16 kb dimeerse avatud tsirkulaarse molekuliga. Samuti näeme lineaarsete fragmentide kaare peal 16 kb suurust signaali, mis vastab lineariseerunud dimeersele molekulile. Lineariseerumine võis toimuda DNA

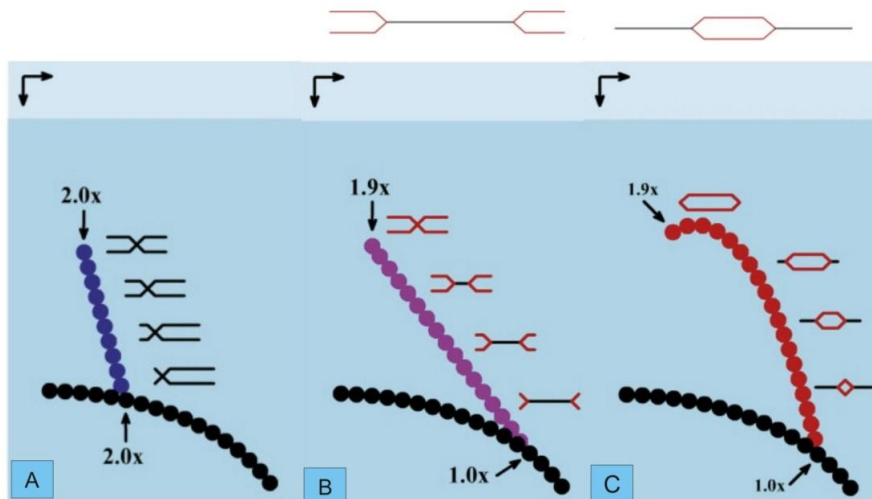
eraldamise käigus või mõnel muul põhjusel. Kindlasti ei esinda need molekulid peremeesraku genoomi integreerunud DNA-d, sest tegu on diskreetsete signaalidega, viiruse integratsioonil genoomi näeksime pigem laialivalguvaid signaale (Cullen et al., 1991).

Kui võrrelda saadud andmeid varem meie laboris läbi viidud katsetega alfabapilloomiviiruste kohta (Marit Orav, avaldamata andmed), siis selgub, et betapapilloomiviirusel esineb kõrgemates konformatsioonides episome varasemates ajapunktides ja rohkemal määral kui alfabapilloomiviirustel. Nii alfa- kui betapapilloomiviiruste puhul võib täheldada, et aja jooksul saavutavad ülekaalu multimeersed vormid ning see näitab, et oligomeersed vormid on proliferuuvates rakkudes eelistatud olekus. Täpsed põhjused, miks see nii on, ei ole teada, kuid arvatakse, et sel viisil suudab viirus hoida oma koopiaarvu kõrgel tasemel ka siis kui genoomilt toimub replikatsiooni- ja teiste varajaste valkude ekspressioon madalal tasemel

3.2. Betapapilloomiviiruse transientse replikatsioonimehhanismi uurimine

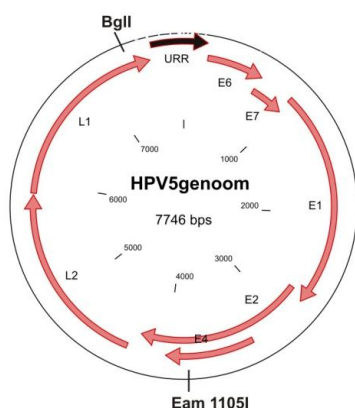
Alfabapilloomiviiruste puhul on näidatud, et transientse amplifikatsiooni ja stabiilse latentse säilumise faasis toimub viiruse replikatsioon bidirektsionaalselt kulgeva *theta* mehhanismi järgi (Flores and Lambert, 1997). Selleks, et tuvastada betapapilloomiviiruste replikatsioonimehhanismi oli vaja uurida replikatsioonil tekkivaid intermediaate ning teada, millised struktuurid on *theta* mehhanismile omased. Replikatsiooni intermediaatide eristamist võimaldav ja selleks regulaarselt kasutatav analüüs on lineariseeritud molekulide 2D geelelektroforees. Replitseeruva molekuli lineariseerimisel eri reistriktaasidega saame lõikekohast sõltuvad erinevad struktuurid. Joonisel 8C on näha replikatsioonimulli struktuur, mis tekib, kui lineariseeritud genoomis esineb replikatsiooni alguspunkt, millelt lähtuvaid replikatsiooniintermediaate ei ole restriktiooni käigus katki lõigatud. Mida kaugemale on jõudnud replikatsioon, seda suurem on replikatsioonimull ja seda aeglasemalt ta geelis liigub (1.9 x molekul). Joonisel 8 B on näha üksteisele lähenevad replikatsioonikahvlid, mis tekivad siis, kui replitseeruv molekul on lineariseeritud origini piirkonna lähedalt. Kui replikatsioon ei ole väga kaugemale jõudnud, siis antud signaal paikneb skeemil 1x lineaarse signaali lähedal ning kui replikatsioon läheneb lõpule, on molekul peaaegu dimeerne ning geelis aeglaselt liikuv (1.9 x molekul). Kõik mittereplitseeruvad molekulid koonduvad 1n lineaarsesse punkti. Kõik replikatsiooniga lõpule jõudvad molekulid on peaaegu dimeeri suurusega.

Dimeer ($2n$) ise lõigatakse katki ning monomeerid kogunevad $1n$ punkti. X struktuurid (Joonis 8A) tekivad homoloogilise rekombinatsiooni käigus ning nad ei ole omased theta replikatsioonile, siiski on neid nähtud alfabapilloomiviiruste replikatsiooni uurimisel (Marit Orav, avaldamata andmed).

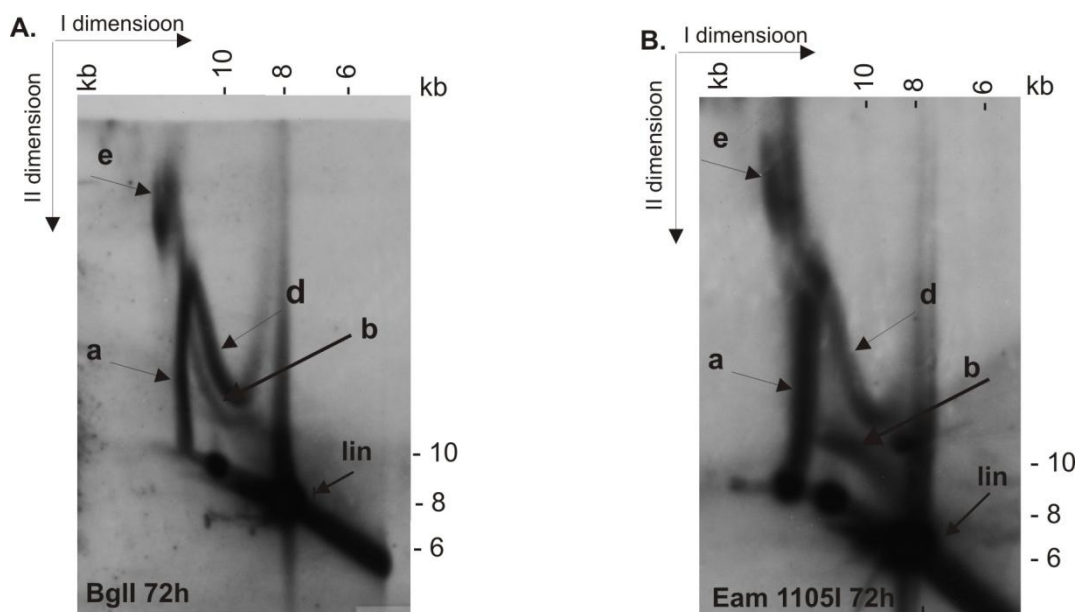


Joonis 8. Erinevad replikatsiooni struktuurid 2D geelelektroforeesil. (A) lineaarsete fragmentide ja homoloogilise rekombinatsiooni kaar. (B) üksteisele lähenevad replikatsioonikahvlid. (C) replikatsioonimull. (Schvartzman et al., 2012).

U2OS rakke transfecteeriti elektroporatsiooni teel $7 \mu\text{g}$ HPV5 genoomiga ning kolm päeva hiljem eraldati Hirt lüüsi meetodil madalmolekulaarne DNA. Proovid lineariseeriti restriksiooniensüümiga BglI (joonis 10.A), mis lineariseerib genoomi arvatava replikatsiooni alguspunkti lähedalt, või restriктаasiga Eam1105I (joonis 10.B), mis lineariseerib genoomi arvatava origini piirkonna vastast. DNA lahutati 2D geelelektroforeesil ning tulemusi analüüsiti Southern blot meetodil kasutades hübriidsatsiooniproovina HPV5 täispikka genoomi. Piisavalt tugeva signaali saamiseks kasutati üheks analüüsiks nelja 100 mm läbimõõduga koekultuuritassi jagu rakke. Kasutatud lineariseerivate ensüümide lõikekohad genoomis on esitatud joonisel 9.



Joonis 9. Restriktaaside BglI ja EamI 1105I lõikekohtade asumine HPV5 genoomis.



Joonis 10. (A) Transientse replikatsiooni intermediaatide tuvastamine 2D geelelektroforeesil. U2OS rakke transfecteeriti elektroporatsiooni teel 7 μ g HPV5 DNA-ga ja 3 μ l kandja DNA-ga. Kolm päeva hiljem eraldati Hirt lüüsi meetodil madalmolekulaarne DNA, mis lineariseeriti restriktsooniensüümiga (A) BglI või (B) Eam1105I. DNA lahutati 2D geelelektroforeesil ning tulemusi analüüsiti Southern blot meetodil kasutades hübriidsatsiooniproovina HPV5 täispikka genoomi. Ühes analüüsis kasutati nelja 100 mm läbimõõduga koekultuuritassi jagu rakke. 1kb DNA ladderi markerid esimese dimensiooni jaoks on esitatud üleval servas, teise dimensiooni markerid jooskevad paremal joonise kõrval.

Tegelikult analüüsis esineb palju erinevaid struktuure korraga. Restriktsooniensüüm BglI lõikab HPV5 genoomi origini lähedalt ning kui HPV5 genoomi replikatsioon järgib *theta* replikatsioonimehhanismi, siis ei tohiks proovis esineda replikatsioonimulli sisaldavaid molekule, kuna replikatsioonimull lõigatakse katki. Selle asemel peaksime me nägema üksteisele lähenevaid replikatsioonikahvleid nagu oli kujutatud joonisel 8B. Antud struktuurid on näha ka joonisel 10A (struktuur b). Struktuur a vastab homoloogilise rekombinatsiooni läbinud molekulidele ning struktuurid d ja e ei ole seni veel üheselt identifitseeritud. Restriktaas Eam1105I lõikab HPV5 genoomi origini vastast ning *theta*

replikatsioonimehhanismi toimumise eeldusel peaks lõikuse tulemusel tekkima fragment, mis sisaldab replikatsioonimulli nagu näidatud joonisel 8C. Lõikuse tulemusel näeme replikatsioonimullidele vastavaid struktuure (10B struktuur b), kuid taas esineb proovis ka X struktuure (10 B struktuur a) ning seni identifitseerimata molekule (10B struktuurid d ja e). Theta mehhanismile omaselt on HPV5 replikatsioonil näha nii originilt lähtuvat replikatsioonimulli kui kahesuunaliselt liikuvaid replikatsioonikahvleid. Antud analüüsi tulemused viitavad sellele, et betapapilloomiviiruste replikatsioon hõlmab vähemalt mingil määral theta replikatsioonimehhanismi. Lisaks tavalistele struktuuridele on tulemustes näha ka X struktuurid ja seni veel identifitseerimata struktuurid, mida on nähtud ka viirustüvega HPV18 tehtud katsetes (Marit Orav, avaldamata andmed). Seega peab lisaks theta mehhanismile veel mingi replikatsioonimehhanism olema. X struktuuride olemasolu tõttu võib arvata, et rekombinatsioonimehhanism hõlmab ka rekombinatsiooni. Võimalik, et hetkel veel tundmatud struktuurid on seotud viirusgenoomi oligomeersete vormide esinemisega. Sellele vaatamata saab kindlalt väita, et vaatamata suurtele bioloogilistele erinevustele alfa- ja betapapilloomiviiruste koetropismi ja URR-i piirkonna organiseerutuse näol on viiruste replikatsioonimehhanism sama.

3. 3. Minimaalse *cis*- piirkonna määramine

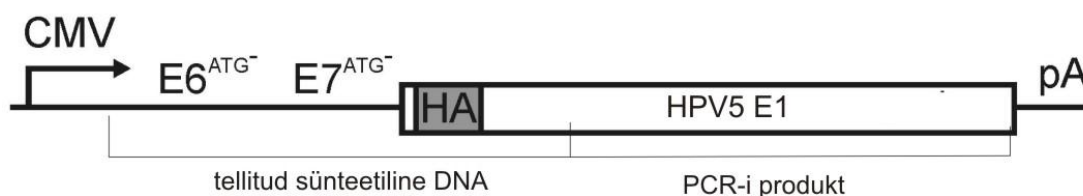
Minimaalne origin on defineeritud kui väikseim *cis*- järjestusi sisaldav regioon, mis suudab toetada replikatsiooni toimumist *trans*- faktorite olemasolul (del Solar et al., 1998). Minimaalne origin paikneb URR-i piirkonnas, mis erineb oluliselt alfa- ja betapapilloomiviiruste vahel. Esimeste puhul on minimaalset origini uuritud ning näidatud, et efektiivseks replikatsiooniks piisab kahe E2BS-i olemasolust või ühe E1BS-i ja E2BS-i olemasolust (Sverdrup and Khan, 1995). Betapapilloomiviirustega sarnaseid katseid ei ole tehtud sobiva mudelsüsteemi puudumise tõttu. Erinevused nende kahe viirusperekonna URR-i piirkonna ülesehituses lubavad oletada, et replikatsiooniks vajalik minimaalne *cis*- järjestus võib nende kahe perekonna vahel oluliselt erineda.

Papilloomiviiruste replikatsioonil on vajalikeks viiruslikeks *trans*-faktoriteks valgud E1 ja E2 (Ustav et al., 1993). Varasemalt on meie laboris edukalt konstrueeritud ekspressioonivektorid kõrge-riski alfa-papilloomiviiruste ja nahka nakatavate HPV8 ja HPV38 E1 valgu jaoks (Airiin Laaneväli magistritöö, 2012), kuid HPV5 E1 ekspressioonivektor puudus. Selleks, et

kirjeldada minimaalset *cis*-regiooni HPV5 puhul, tuli konstrueerida HPV5 E1 valku ekspresseeriv vektor.

3.1.1 HPV 5 E1 ekspressioonivektori konstrueerimine ja testimine U2OS rakuliinis

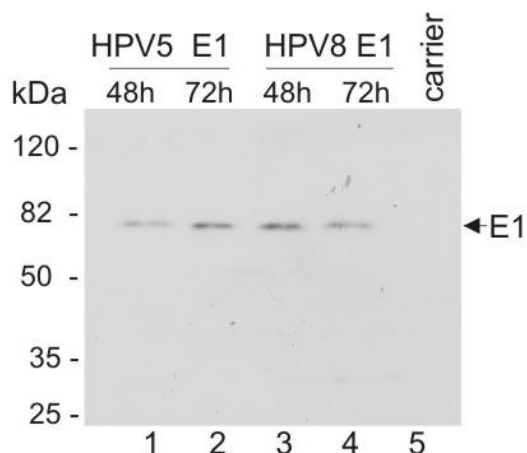
E1 lugemisraam on HPV genoomi suurim ning konserveerunuim. Viiruse elutsükli varastes staadiumites toimub transkriptsioon varajaselt promootorilt E6 lugemisraami ees ning transkribeeritakse polütsistronset mRNA-d, millel paiknevad E1 lugemisraamile lisaks onkovalkude E6 ja E7 lugemisraamid. *Cis*-elemendid E1 lugemisraami ees on olulised E1 ekspressiooni jaoks, samas E7 ORFi rikkumine võimendab E1 ekspressiooni (Lace, 2008). Meie laboris on replikatsiooni uurimiseks kasutatavatel E1 ekspressioonivektoritel E6 ja E7 ATG koodon muteeritud ACG-ks, et rikkuda nende valkude lugemisraam. Lisaks puudub E1 valgu vastu spetsiifiline antikeha ning selleks, et valgu olemasolu hiljem *Western blot*-i peal kontrollida, viidi E1 lugemisraami algusesse sisse gripiviiruse hemaglutiniini epitoop (HA-tag), mida hiljem saab detekteerida 3F10-HRP antikehaga. Mutatsioonide tegemiseks disainiti 1088 bp pikkune sünteetiline DNA E1 lugemisraami järjestusega, kuhu oli sisse viidud HA-tag ning mutatsioonid E6 ja E7 lugemisraami ATG koodonis, mille tulemusel neid ei ekspresseerita. Teine pool E1 lugemisraamist 961-2781 amplifitseeriti PCR-iga. Saadud fragmendid kloneeriti etapiviisiliselt pQM-Ntag/Ai-vektoris, mis sisaldab tugevat CMV promootorit, SV40 replikatsiooni alguspiirkonda, polü-A signaali, ampitsiliini resistentsusgeeni, β -globiini intronit, mis on näidatud, et suurendab toodetava valgu hulka.



Joonis 11. Konstrueeritud HPV5 E1 ekspressioonivektori skemaatiline ülevaade. E1 ekspressioonivektor sisaldab CMV promootorit, mis tagab valgu ekspressiooni ning gripiviiruse hemaglutiniini epitoop *tag-i* (HA), millega abil on võimalik *Western blot* meetodil detekteerida ekspresseeritava E1 valgu tasemeid kasutades HA-*tag-i* vastast antikeha 3F10-HRP. Näidatud on E6 ja E7 ORF-idelt ATG koodoni deletsioon, mille tulemusel ei sünteesita vektorilt onkovalke E6 ja E7.

E1 valgu ekspressiooni hindamiseks ekspressioonivektorilt transfecteeriti 500 ng ekspressioonivektorit U2OS rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. Varasemalt on teada, et

HPV8 E1 ja HPV5 E1 valgud on väga kõrge homoloogiaga ning mõlema suurus on koos koos HA- tag-iga 70,2 kDa, seetõttu kasutati HPV5 E1 valgu positiivseks kontrolliks HPV8 E1 ekspressioonivektori transfektsiooni U2OS rakkudes. Negatiivseks kontrolliks transfektsiooni U2OS rakke 30 µg kandja DNA-ga. 48 ja 72 h pärast lüüsi rakud Laemmli puhvriga. E1 valgust tuvastati Western Blot analüüsil HA-tag järgi.



Joonis 12. Konstrueeritud HPV5 E1 valgu ekspressioonivektori testimine U2OS rakuliinis. U2OS rakkudes transfektsiooni elektroporatsiooni meetodil 500ng HPV5 E1 ekspressioonikonstrukti (radad 1 ja 2) koos 30 µg kandja (carrier) DNA-ga. Kontrollidena kasutati HPV8 E1 ekspressioonivektoriga (radad 3 ja 4) ning ainult kandja DNA-ga transfektsioon U2OS rakke (rada 5). 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni lüüsi rakud Laemmli puhvriga ja analüüsi Western Blot meetodil, kasutades E1 valgu detekteerimiseks HA-tag'i vastast antikeha. Suurusmarkeriks kasutati Prestain Protein marker-it.

Western bloti analüüsist selgus, et konstrueeritud HPV5 E1-pQM-NTAi ekspressioonivektor ekspresseerib E1 valku, mille suurus on vastavuses HPV8- pQM-NTAi ekspressioonivektori poolt ekspresseeritavaga. Õige valgu tootmist kinnitasid ka suurusmarkerid ning negatiivne kontroll, mille puhul signaali ei detekteeritud.

3.1.2. HPV5 minimaalsete originikonstruktide disain ja konstrueerimine

Minimaalse origini määramiseks on vaja teada E2 ja E1 seondumiskohtade positsioone. E2 seondub URR-i piirkonnas konserveerunud järjestusele ACCN6GGT. Selle järgi asetsevad E2 seondumissaidid HPV5 genoomis joonisel 13 toodud skeemi järgi. E1 seondumiskoht ei ole täpselt määratletud ning varieerub erinevate papilloomiviiruste perekondade ja tüüpide vahel. Joonisel 14 on toodud erinevate papilloomiviiruste tüvede teadaolevad E1 valgu seondumisjärjestused.

HPV-16	ATTGTAGTT	TAGTATTAT] <i>alpha</i>
HPV-11	ATTGTTATT	AACTATAAG	
HPV-8	GTTATTGCC	AACAACCAT	<i>beta</i>
BPV-1	ATTGTTGTT	AACAATAAT] <i>delta</i>
OvPV-1	ATTGTTGTT	AACAATAAT	
HPV-1	ATGGTAGTT	AACAACAAC	<i>mu</i>
HPV-4	ATCATAGTT	GGCAACAAT	<i>gamma</i>
CRPV	GTTGTTGCT	AACAATAAT	<i>kappa</i>

Joonis 13. Erinevate papilloomiviiruste perekondade ja tüvede teadaolevad E1 valgu seondumisjärjestused genoomis. (McBride, 2008).

HPV5 puhul ei ole E1 valgu seondumisjärjestust täpselt määratletud, kuid on näidatud, et HPV5 ja HPV8 on üksteisele fülogeneetiliselt lähedased tüübid (*Gottschling et al., 2007*) ning suudavad vajadusel üksteise replikatsioonivalke origini replikatsioonis asendada (Airiin Laaneväli magistritöö, 2012). Seega lähtusime HPV5 E1 seondumiskiirkonna määramisel HPV8 seondumisjärjestusest ning leidsime HPV5 genoomis kõrge homoloogiaga piirkonna positsioonides 60-77, mille nukleotiidne järjestus on- TTGTTGCCAACTACCAT.

Kõik HPV5 URR-i- originikonstruktid konstrueeriti vastavalt „Materjal ja Metoodika“ all välja toodud kirjeldusele. Selle tulemusel saadi plasmiidid, mis sisaldasid erineva pikkusega HPV5 URR-i fragmente.

HPV5-URR-pUC18 on plasmiid, mis sisaldab HPV5 täispikka 478 nukleotiidi pikkust URR-i fragmenti kloneerituna puc18 vektorisse. Selles on olemas 4 E2 seondumiskohta, E1 seondumiskoht ja TATA järjestus. Viimane teadaolev betapapillomiviiruste E2 seondumiskoht asub L1 lugemisraami sees ning jäi analüüsimisest kõrvale. URR-i fragmendi pikkus- 478 nukleotiidi.

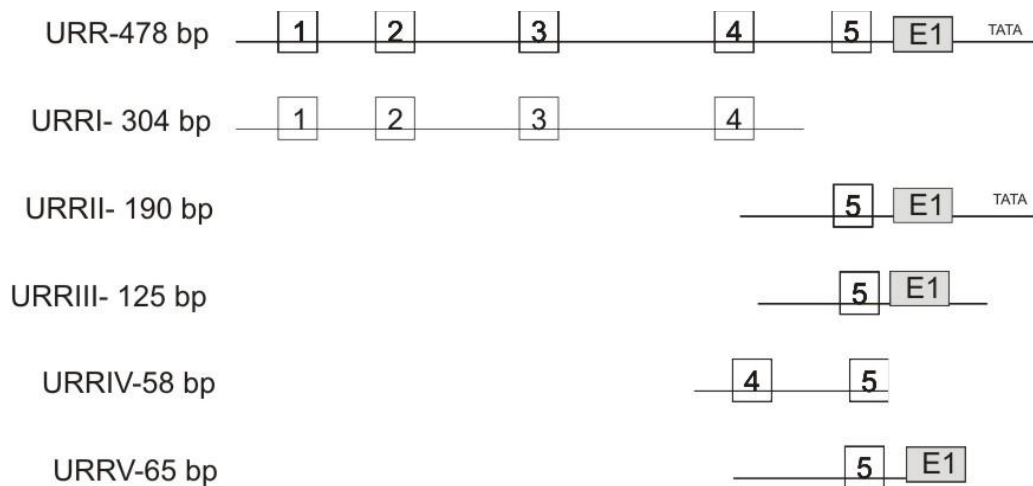
HPV5-URRI-puc18 plasmiid sisaldab HPV URR-i 304 nukleotiidi pikkust fragmenti ning selles on olemas 3 E2 seondumiskohta. Puudu on viimane E2BS, E1BS ning TATA järjestus. URR-i fragmendi pikkus-304 nukleotiidi.

HPV5-URRII-puc18 plasmiid sisaldab piirkonda alates alates E2 seondumiskohast kuni URR-i lõpuni. Sellel on olemas 1 E2 seondumiskoht, 1 E2 seondumiskoht ning TATA järjestus. URR-i fragmendi pikkus- 190 nukleotiidi.

HPV5-URRIII-pUC18 plasmiid sisaldab 125 nukleotiidi pikkust piirkonda viimasest E2BS-ist kuni TATA järjestuseni, sinna vahele jääb ka E1 seondumiskoht. URR-i fragmendi pikkus- 125 nukleotiidi.

HPV5-URRIV-pUC18 plasmiid sisaldab kahte kokku sulatatud 58 nukleotiidi pikkust oligot, mis on sisestatud pUC18 plasmidi. Järjestuse alusel on olemas kaks E2 seondumiskohta. Fragmendi pikkus- 58 nukleotiidi.

HPV5-URRV-pUC18 plasmiid sisaldab kahte kokku sulatatud 65 nukleotiidi pikkust oligot, mis on sisestatud pUC18 plasmidi. Järjestuse alusel on olemas üks E2 seondumiskoht ja E1 seondumiskoht. Fragmendi pikkus- 65 nukleotiidi.

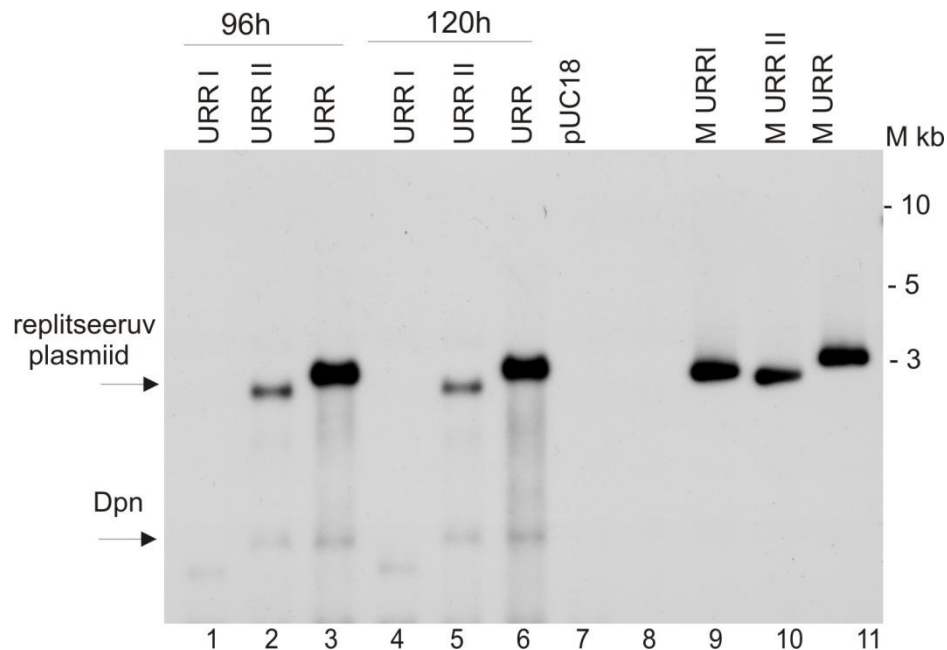


Joonis 14. pUC18-sse sisestatud erineva pikkusega HPV5 URR-i fragmendid. Eraldi on välja toodud E2 valgu seondumiskohad numbritega 1-5 ning E1 valgu seondumiskoht halli kastiga. Välja on toodud ka A/T rikka järjestuse paiknemine.

3.1.3 Originikonstruktide replikatsiooni määramine

Määramaks, kas konstrueeritud URR-i konstruktid sisaldavad vajalikke *cis* -elemente HPV5 replikatsiooni initsiatsiooniks E1 ja E2 valgu juuresoleksul, transfekteriti 500 ng URR-puc18 konstrukte koos 250 ng HPV5 E1-pQM-NTAi ja HPV5E2 pQM-NTAi ekspressioonivektoriga U2OS rakkudes. 96h ja 120h tundi pärast transfektsiooni eraldati madalmolekulaarne DNA Hirt lüüsi meetodil ning restrikteeriti ensüümidega SacI ja DpnI. DpnI lõikab katki rakkudesse sisse transfekteritud bakteriaalse metülatsioonimustriga DNA ning jätab alles eukarüootses rakus juurde replitseerunud DNA. Replikatsioonisignaali

detekteeriti HPV5 täispika radioaktsiivselt märgistatud URR-i prooviga. URR-i ja ekspressioonivektorite kontsentratsioonid on kõikides katsetes konstantsed ja valitud eelnevalt teostatud katsete põhjal. Samuti oli katse eesmärgiks veenduda, et minu konstrueeritud HPV5 E1-pQM-NTAi ehk HPV5 E1 ekspressioonivektor suudab E2 ekspressioonivektori olemasolul tagada HPV5-URR-i põhise replikatsiooni toimumise.



Joonis 15. HPV-5 URR-i erinevate pikkustega fragmentide- puc18 plasmiidide replitseerumine U2OS rakuliinis koos HPV5 E1, HPV5 E2 ekspressioonivektoriga. U2OS rakkudesse transfecteeriti elektroporatsiooni meetodil 500 ng HPV5 URR-i fragmendi-puC18 plasmidi, 250 ng E2 ekspressioonivektorit ning 250ng HPV5 E1 ekspressioonivektorit. 96 ja 120 tundi pärast transfectsiooni eraldati madalamolekulaarne DNA Hirt lüüsi meetodil ning restrikteeriti ensüümidega SacI ning DpnI. DNA lahutati geelelektroforeesil ning tulemusi analüüsiti Southern blot meetodil kasutades hübriidsatsiooniproovina HPV5 täispikka URR-i. Read 1-6 erinevate pikkustega URR-i fragmendid pUC18 plasmidi klonieerituna. Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult puC18 vektoriga transfecteeritud rakke (rida 7). Markeriteks on kasutatud 300pg plasmiidikonstrukte (read 9-11).

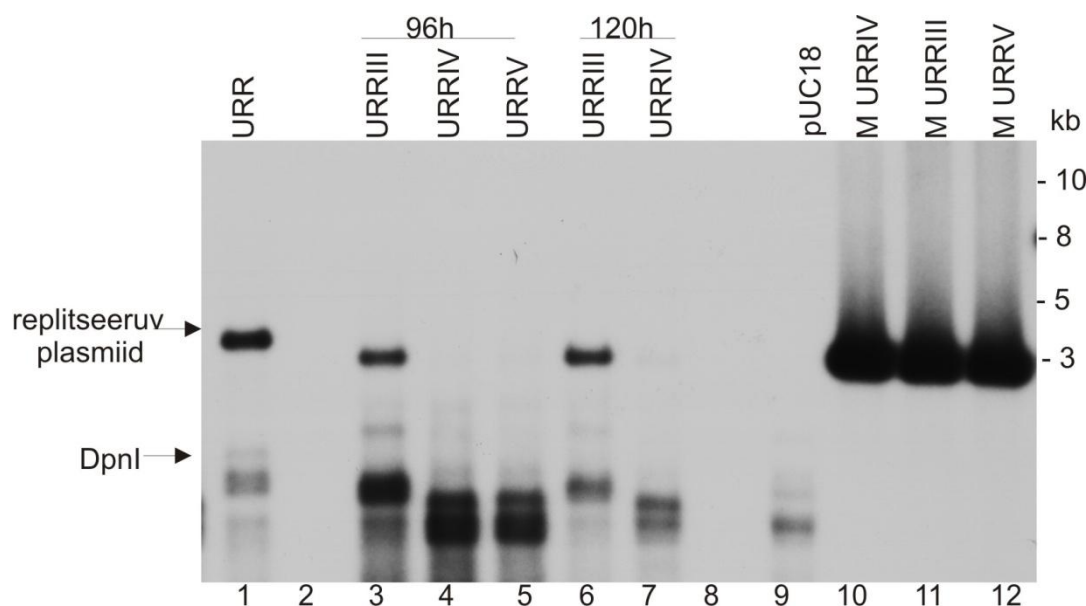
Katsest selgus, et konstrueeritud HPV5 E1 ekspressiooniplasmiidilt sünteesitav E1 valk on funktsionaalne ning ekspressioonitase on piisav, initsieerimaks viiruse replikatsiooni alguspunkti sisaldava plasmidi replikatsiooni.

Lisaks täispikale URR-ile replitseerub ka fragmenti URRII sisaldav plasmiid (rida 2 ja 5). pUC18-URRI, kus puuduvad E1BS ja viies E2BS, ei replitseeru. Kirjanduslike andmete põhjal võib sellest eeldada, et replikatsiooni initsiatsiooniks on E1 seondumiskoha olemasolu ülioluline või kõik URR-i alguses paiknevad E2BS-id on madala afiinsusega ning ei suuda üksinda replikatsiooni initsieerida. URRII fragmenti sisaldav plasmiid annab täispika URR-iga

võrreldes palju madalama replikatsioonisignaali ning see näitab, et lisanduvad E2 seondumiskohad tugevdavad replikatsiooni toimumist. URRII fragment sisaldab endas lisaks E1 ja E2 seondumisjärjestusele ka TATA järjestust, mis asub URR-i lõpuosas. Edasiseks minimaalse origini määramiseks keskendun URR-i piirkonnale E1 seondumiskohast kuni E6 lugemisraami alguseni.

On teada, et papilloomiviiruse URR-i replikatsioon võib toimuda ka tingimustes, kus ekspresseeritavad E1 ja E2 valgud on pärit teisest viirustüvest. Näiteks on tõestatud, et madalariski alfapapilloomiviiruse HPV-1a E1 valk on võimeline koos E2 valguga toetama kõrgeriski viiruse HPV18 täispika URR-pUC18 plasmidi replikatsiooni, kuid lühemaid URR-i fragmente sisaldavad plasmiidid replitseeruvad vaevu märgataval tasemel (Sverdrup and Khan, 1995). Meie laboris on varasemalt näidatud, et HPV5 URR-i replikatsioon toimub, kui ekspresseeritav E1 valk on pärit viirustüvest HPV8 (Airiin Laaneväli magistritöö, 2012). Selleks, et hinnata HPV 5 E1 ekspressioonivektori funktsionaalsust ja HPV8 ning HPV5 E1 valgu homoloogia suurust, viisin kõik minimaalse origini katsed paralleelselt läbi ka kasutades HPV5 E1 ekspressioonivektori asemel HPV8 E1 valgu ekspressioonivektorit. Olenemata fragmentide suurusest ei nähtud tehtud katsetes tulemuslikke erinevusi.

Homoloogia hindamiseks transfekeeriti 500 ng URR-puc18 konstrukte koos 250 ng HPV8 E1-pQM-NTAi ja HPV5E2 pQM-NTAi ekspressioonivektoriga U2OS rakkudesse ning edaspidi toiminis sarnaselt eelnevalt sooritatud katsega. Täispika URR-i prooviga hübridisatsioon andis väga nõrgad signaalid ning seetõttu sooritasin uue hübridisatsiooni lineariseeritud pUC-URR plasmiidiga. Tulemused on joonisel 15.



Joonis 16 . HPV5 URR-i erinevate pikkustega fragmentide- puc18 plasmiidide replitseerumine U2OS rakuliinis koos HPV8 E1 ja HPV5 E2 ekspressioonivektoriga. U2OS rakkudesse transfecteeriti elektroporatsiooni meetodil 500 ng HPV5 URR-i fragmenti-puC18 plasmidi, 250 ng HPV5 E2 ekspressioonivektorit ning 250ng HPV8 E1 ekspressioonivektorit. 96 ja 120 tundi pärast transfectsiooni eraldati madalamolekulaarne DNA Hirt lüüsi meetodil ning restrikteeriti ensüümidega SacI ning DpnI. DNA lahutati geelelektroforeesil ning tulemusi analüüsiti Southern blot meetodil kasutades hübriidsatsiooniproovina pUC18- HPV5URR-i lineariseeritud plasmidi. Rida 1- täispikka HPV5 URR-i sisaldav plasmid. Read 3-7 erineva pikkusega URR-i fragmentid pUC 18 plasmidis. Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult puC18 vektoriga transfecteeritud rakke (rida 9). Markeriteks on kasutatud 300pg plasmidikonstrukte (read 10-12).

Katsest selgus, et HPV5 E1 ekspressioonivektori asemel HPV8 E1 valgu ekspressioonivektori kasutamisel ei esine erinevusi URR- i fragmentide replikatsoonis. See kinnitab, et viiruse trans- valkude omavahelised interaktsioonid ja seondumine DNA-ga on vähemalt nende kahe betapapilloomiviiruse puhul konserveerunud ning suudavad vajadusel üksteise *trans* faktoreid asendada.

Kuna URR-i fragmentide pikkus erineb vaid paarikümne bp võrra ja need kõik on kloneeritud pUC18 plasmidi, siis nende suurus geelelektroforeesil on enam vähem sarnane (markerid ridadel 10-12) .

Analüüsid väiksemate URR-i fragmentidega näitasid, et U2OS rakkudes replitseerub veel 125 bp pikkune URRIII (rida 3 ja 6), mis sisaldab arvatava E1 ja E2 valgu viiendat seondumiskohta, kuid lõpeb enne A/T rikka järjestuse algust. Sellest järeldub, et ühe E1 ja E2 seondumispäiga olemasolu on piisav HPV5 replikatsiooni initseerimiseks. Saadud andmed

korreleeruvad HPV18 URR-iga (Sverdrup and Khan, 1995) ja HPV11-ga läbiviidud katsetega (Lu et al., 1993), milles 1 E2BS koos E2BS-iga initseeris replikatsiooni.

Minimaalse origini replikatsioonikatsest selgus, et A/T rikka järjestuse olemasolu ei ole vajalik replikatsiooni toimumiseks. Siiski on näidatud, et A/T järjestuse puudumisel on replikatsiooni efektiivsus vähenenud 5% (Lee et al., 1997), kuid minu katsete ülesehitus ei võimaldanud seda kontrollida. Palju olulisem on aga see, et URRIV ja URRV fragmente sisaldavad plasmiidid ei replitseerunud. URRIV- pUC18 plasmiid (joons 14) sisaldab kahte E2 valgu seondumiskohta ning on teada, et taoline fragment suudab käituda minimaalse originina HPV11 puhul (Lu et al., 1993). HPV18 puhul on teada, et 33 bp pikkune sünteetiline DNA järjestus suudab initseerida replikatsiooni, kui see sisaldab kahte kõrge afiinsusega E2BS-i (Sverdrup and Khan, 1995). Varasemad uuringud on näidanud, et kõrgema afiinsusega seostub alfa papilloomiviiruste puhul E2 valk seondumiskohtadele, mille linkerosas esinevad A/T nukleotiid, beta papilloomiviiruste E2 seondumiskohtades aga näeb eelistust G/C nukleotiidide osas. A/T nukleotiide sisaldavat origini piirkonda on lihtsam painutada ning see hõlpsustab DNA ahelate lahtiharutamist (Rogers et al., 2011). HPV5 E2BS-id sisaldavad rohkemal määral G/C nukleotiide, see võib olla üks põhjus, miks replikatsiooni ei suudeta kahe E2BS-i olemasolul initseerida. URRV fragment sisaldab ühte E2BS-i ja ühte E1BS-i ning kõigi eelduste kohaselt peaks ta rakkudes replitseerima, sest ei erine URRIII fragmendist E1 ja E2 seondumiskohtade poolest. URRV fragment erineb URRIII fragmendist umbes 60 nukleotiidi võrra (joonis 13), mis asuvad E1 oletatavast seondumiskohast allpool. Seega saame selle katse tulemuste põhjal järeldada, et selles piirkonnas asub HPV5 replikatsiooniks oluline *cis*-järjestus. Selle piirkonna olulisuse täpsemaks iseloomustamiseks on vajalikud edasised katsed. Praegu tehtud katsete puhul saab väita, et HPV5 replikatsiooniks minimaalne vajalik *cis*-järjestus paikneb 125 bp pikkusel järjestusel ning sisaldab ühte E1 ja ühte E2 seondumiskohta.

KOKKUVÕTE

Käesolev töö keskendub inimese betapapilloomiviiruse DNA replikatsiooni ja selleks vajalike cis-faktorite uurimisele. Kirjandusliku ülevaate osas kirjeldatakse inimese papilloomiviiruste mitmekesisust ja antakse ülevaade viiruse elutsüklist ning tähtsamatest valkudest. Samuti kirjeldatakse U2OS mudelsüsteemi kui olulist võimalust uurimaks seni väga vähe uuritud betapapilloomiviiruste replikatsiooni.

Töö eksperimentaalses osas uuritakse betapapilloomiviiruste replikatsioonil tekkivaid intermediaate ja replikatsioonimehhanismi papilloomiviiruse HPV5 näitel. HPV5 replikatsiooniks vajaliku minimaalse järjestuse määramise katsetest selgus, et replikatsiooni alustamiseks vajalik piirkond asub URR tagumises osas, mis sisaldab ühte E2 ja ühte E1 seondumiskohta koos E1 seondumiskohale järgneva piirkonnaga.

Töö tulemused:

- 1) Betapapilloomiviiruse replikatsiooni tulemusel tekivad genoomi multimeersed vormid, mis on ajas suureneva osakaaluga.
- 2) Betapapilloomiviiruste transientne replikatsioon toimub alfabapilloomiviirustega sarnaselt veel täpselt määratlemata *theta* sarnase mehhanismi abil.
- 3) Konstrueeriti HPV5 E1 valgu ekspressioonivektor, mis töötab U2OS rakkudes ja ekspresseerib piisaval hulgal E1 valku.
- 4) Minimaalne replikatsiooniks vajalik piirkond suudeti piiritleda 125 nukleotiidi pikkuseks. Edasised katsed määramaks minimaalset origini täpsemini on vajalikud.

Analysis of betapapillomavirus transient replication mechanism by the example of HPV5

Kristiin Albert

RÉSUMÉ

HPVs are small double-stranded DNA viruses that can cause a wide spectrum of diseases. High risk mucosal HPV infection has been shown to be linked with the development of cervical, anogenital and breast cancer. High-risk cutaneous HPVs are considered to play an active role in the development of non-melanoma skin cancer, which is the most commonly diagnosed cancer in caucasians. Until now it has been difficult to study the life cycle and replication of cutaneous HPVs due to the lack of a suitable cellular model system.

Our research group has established a cellular model system that is based on U2OS osteosarcoma cell- line and supports the replication of cutaneous HPV episomal genome. Therefore, for the first time we have the tools to study molecular aspects of betapapillomavirus replication. My thesis concentrates on the analysis of betapapilloma replication products and intermediates. In addition, efforts towards the identification of the minimal origin requirements for HPV5 replication are shown.

The results obtained during this study indicate that betapapillomaviruses are capable of undergoing episomal genome oligomerisation during replication and multimeric form of the genome is preferred in long time maintenance. The replication mechanism of betapapillomaviruses is theta like mechanism, which is also characteristic to alphapapillomaviruses. For the study of the minimal origin of replication, I engineered a mammalian expression vector for HPV5 E1 protein. The correct identity of the protein was verified by Western blot. Southern blot data revealed that the minimal origin is comprised of a 125 bp long region within the HPV5 URR, but further analysis are needed to confirm these findings.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aldabagh, B., Angeles, J.G., Cardones, A.R., Arron, S.T., 2013. Cutaneous squamous cell carcinoma and human papillomavirus: is there an association? *Dermatologic surgery* : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.] 39, 1-23.
- Antonsson, A., Karanfilovska, S., Lindqvist, P.G., Hansson, B.G., 2003. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *Journal of clinical microbiology* 41, 2509-2514.
- Barbosa, M.S., Vass, W.C., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1991. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *Journal of virology* 65, 292-298.
- Bastien, N., McBride, A.A., 2000. Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology* 270, 124-134.
- Bedell, M.A., Hudson, J.B., Golub, T.R., Turyk, M.E., Hosken, M., Wilbanks, G.D., Laimins, L.A., 1991. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *Journal of virology* 65, 2254-2260.
- Bernard, H.U., 2013. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: An overview and recent developments. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*.
- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H., de Villiers, E.M., Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70-79.
- Bodily, J., Laimins, L.A., 2011. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology* 19, 33-39.
- Brentjens, M.H., Yeung-Yue, K.A., Lee, P.C., Tyring, S.K., 2002. Human papillomavirus: a review. *Dermatologic clinics* 20, 315-331.
- Chen, G., Stenlund, A., 2002. Sequential and ordered assembly of E1 initiator complexes on the papillomavirus origin of DNA replication generates progressive structural changes related to melting. *Molecular and cellular biology* 22, 7712-7720.
- Chin, M.T., Broker, T.R., Chow, L.T., 1989. Identification of a novel constitutive enhancer element and an associated binding protein: implications for human papillomavirus type 11 enhancer regulation. *Journal of virology* 63, 2967-2976.
- Chow, L.T., Broker, T.R., 1994. Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* 37, 150-158.

Cogliano, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Cancer, W.H.O.I.A.f.R.o., 2005. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *The lancet oncology* 6, 204.

Cullen, A.P., Reid, R., Campion, M., Lorincz, A.T., 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *Journal of virology* 65, 606-612.

Culp, T.D., Christensen, N.D., 2004. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 319, 152-161.

D'Abramo, C.M., Archambault, J., 2011. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. *The open virology journal* 5, 80-95.

de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.

del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62, 434-464.

Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M., Thierry, F., 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *Journal of virology* 71, 9343-9349.

Dong, G., Broker, T.R., Chow, L.T., 1994. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *Journal of virology* 68, 1115-1127.

Doorbar, J., 2005. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 32 Suppl 1, S7-15.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., Stanley, M.A., 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5, F55-70.

Duensing, S., Munger, K., 2004. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 109, 157-162.

Fakhry, C., Westra, W.H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J.A., Pinto, H., Forastiere, A., Gillison, M.L., 2008. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 261-269.

Feltkamp, M.C., de Koning, M.N., Bavinck, J.N., Ter Schegget, J., 2008. Betapapillomaviruses: innocent bystanders or causes of skin cancer. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 43, 353-360.

- Flores, E.R., Lambert, P.F., 1997. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *Journal of virology* 71, 7167-7179.
- Fradet-Turcotte, A., Moody, C., Laimins, L.A., Archambault, J., 2010. Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2 phosphorylation and required for viral genome maintenance. *Journal of virology* 84, 11747-11760.
- Garcia-Vallve, S., Iglesias-Rozas, J.R., Alonso, A., Bravo, I.G., 2006. Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: convergence and divergence in the upstream regulatory region. *BMC evolutionary biology* 6, 20.
- Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., Reinson, T., Ustav, M., Jr., Ustav, M., Ustav, E., 2011. Development of a cellular assay system to study the genome replication of high- and low-risk mucosal and cutaneous human papillomaviruses. *Journal of virology* 85, 3315-3329.
- Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., Tommasino, M., 2010. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus genes* 40, 1-13.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E., Sapp, M., 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of virology* 75, 1565-1570.
- Guido, M.C., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P., Garcia-Carranca, A., 1992. Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *The Journal of general virology* 73 (Pt 6), 1395-1400.
- Harwood, C.A., Suretheran, T., Sasieni, P., Proby, C.M., Bordea, C., Leigh, I.M., Wojnarowska, F., Breuer, J., McGregor, J.M., 2004. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *The British journal of dermatology* 150, 949-957.
- Hoffmann, R., Hirt, B., Bechtold, V., Beard, P., Raj, K., 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *Journal of virology* 80, 4431-4439.
- Ilves, I., Kivi, S., Ustav, M., 1999. Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *Journal of virology* 73, 4404-4412.
- Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., Ustav, M., 2009. Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* 384, 360-368.
- Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E., Ustav, M., 2007. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *The EMBO journal* 26, 2180-2191.

Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., Sakai, H., 2012. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Frontiers in microbiology* 3, 152.

Kalantari, M., Blennow, E., Hagmar, B., Johansson, B., 2001. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 10, 46-54.

Kanazawa, T., Fukushima, N., Imayoshi, S., Nagatomo, T., Kawada, K., Nishino, H., Misawa, K., Ichimura, K., 2013. Rare case of malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with human papillomavirus type 6 infection and p53 overexpression. *SpringerPlus* 2, 153.

Katsenos, S., Becker, H.D., 2011. Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: apropos of two cases and a brief literature review. *Case reports in oncology* 4, 162-171.

Kay, M.A., He, C.Y., Chen, Z.Y., 2010. A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nature biotechnology* 28, 1287-1289.

Kudoh, A., Fujita, M., Zhang, L., Shirata, N., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Nishiyama, Y., Tsurumi, T., 2005. Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *The Journal of biological chemistry* 280, 8156-8163.

Lee, D., Kim, H., Lee, Y., Choe, J., 1997. Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. *Virus research* 52, 97-108.

Li, X., Coffino, P., 1996. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *Journal of virology* 70, 4509-4516.

Lieber, M.R., 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry* 79, 181-211.

Lilley, C.E., Carson, C.T., Muotri, A.R., Gage, F.H., Weitzman, M.D., 2005. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5844-5849.

Llorente, B., Smith, C.E., Symington, L.S., 2008. Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell cycle* 7, 859-864.

Lu, J.Z., Sun, Y.N., Rose, R.C., Bonne, W., McCance, D.J., 1993. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *Journal of virology* 67, 7131-7139.

McBride, A.A., Oliveira, J.G., McPhillips, M.G., 2006. Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell cycle* 5, 1499-1502.

- McLaughlin-Drubin, M.E., Munger, K., 2008. Viruses associated with human cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1782, 127-150.
- Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., Iliakis, G., 2013. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Frontiers in oncology* 3, 113.
- Moody, C.A., Laimins, L.A., 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. Cancer* 10, 550-560.
- Muller, M., Demeret, C., 2012. The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network. *The open virology journal* 6, 173-189.
- Nakahara, T., Peh, W.L., Doorbar, J., Lee, D., Lambert, P.F., 2005. Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *Journal of virology* 79, 13150-13165.
- Nindl, I., Gottschling, M., Stockfleth, E., 2007. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Disease markers* 23, 247-259.
- Oberle, C., Blattner, C., 2010. Regulation of the DNA Damage Response to DSBs by Post-Translational Modifications. *Current genomics* 11, 184-198.
- Patterson, N.A., Smith, J.L., Ozbun, M.A., 2005. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *Journal of virology* 79, 6838-6847.
- Remm, M., Brain, R., Jenkins, J.R., 1992. The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18. *Nucleic acids research* 20, 6015-6021.
- Remm, M., Remm, A., Ustav, M., 1999. Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *Journal of virology* 73, 3062-3070.
- Richardson, H., Kelsall, G., Tellier, P., Voyer, H., Abrahamowicz, M., Ferenczy, A., Coutlee, F., Franco, E.L., 2003. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 12, 485-490.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 73, 39-85.
- Schvartzman, J.B., Martinez-Robles, M.L., Lopez, V., Hernandez, P., Krimer, D.B., 2012. 2D gels and their third-dimension potential. *Methods* 57, 170-178.
- Stanley, M., 2008. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic oncology* 109, S15-21.

- Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K., Beard, P., 1998. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *Journal of molecular biology* 283, 529-536.
- Sverdrup, F., Khan, S.A., 1995. Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *Journal of virology* 69, 1319-1323.
- Zheng, Z.M., Baker, C.C., 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11, 2286-2302.
- Underbrink, M.P., Howie, H.L., Bedard, K.M., Koop, J.I., Galloway, D.A., 2008. E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *Journal of virology* 82, 10408-10417.
- Ustav, E., Ustav, M., Szymanski, P., Stenlund, A., 1993. The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 898-902.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P., Stenlund, A., 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *The EMBO journal* 10, 4321-4329.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Munoz, N., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189, 12-19.
- Weissenborn, S., Neale, R.E., Waterboer, T., Abeni, D., Bavinck, J.N., Green, A.C., Harwood, C.A., Euvrard, S., Feltkamp, M.C., de Koning, M.N., Naldi, L., Quint, W.G., Tessari, G., Proby, C.M., Wieland, U., Pfister, H., group, E.-H.-U.-C., 2012. Beta-papillomavirus DNA loads in hair follicles of immunocompetent people and organ transplant recipients. *Medical microbiology and immunology* 201, 117-125.
- Weitzman, M.D., Lilley, C.E., Chaurushiya, M.S., 2010. Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annual review of microbiology* 64, 61-81.

LISAD

Lisa1.

pUC18-URR konstruktide valmistamiseks kasutatud oligonukleotiidid:

1) PrHPV5URRXbaI_F –

5'ATTCTAGAGGTCTGACCGAAAGTGG 3'

2) PrHPV5URREcoRI-

5'CAAGAAGACATTAGTCCGTCTTAAGTA 3'

3)PrHPV5URRIEcoRI_R-

5'ACCGAATTCACAAGAAAATTGC 3'

4) PrHPV5URRIII_R –

ACCGAATTCTATTGGATATTGTTAACA 3'

5) PrHPV5URRIIXbaI_F-

5'ATTTCTAGAGTTGCAATTTTCTTG 3'

6) PrHPV5E1XbaF -

5'GGTCTAGAATGACGGATCCTAATTCTAAAG 3'

7) PrHPV5E1XmaI_R 211-

5'GCAAAGTTACGAGACGTTCTGGGCCCTA 3'

8) pUC18-URRIV oligonukleotiidid:

5'ACGACCGTTAACGGTAAGTTGCAATTTTCTTGTACCAGGTGCGGTATTAAGATT
TCAC 3' ja

5'GTGAAATCTTAATACCGCACCTGGTACAAGAAAATTGCAACTTACCGTTAACGG
TCGT 3'

9) pUC18-URRV oligonukleotiidid:

5'CTTGTACCAGGTGCGGTATTAAGATTTTACAATTGTAATGGTTGTTGCCAACTA
CCATAGGCATA 3' ja

5'TATGCCTATGGTAGTTGGCAACAACCATTACAATTGTGAAATCTTAATACCGCA
CCTGGTACAAG 3'

Lisa 2.

1) E1 ekspressioonivektori konstrueerimisel kasutatud sünteetilise DNA järjestus:

5'CCTTCTAGAGCTGAGGGAGCCGAACACCAACCAAACTGACAGAAAAAGATAA
GGCAGAATTCCTTCAAGTATTAGAGAGTTAGCTGAAACCTTAGGCATCCCTCTG
ATTGATTGTTTAATACCTTGCAATTTCTGTGGCAAATTTCTAAATTATTTGGAAGC
TTGCGAATTCGACTACAAAAAACTTAGTCTAATTTGGAAAGATTATTGTGTGTTTG
CGTGCTGTCGCGTATGCTGTGGCGCCACTGCAACTTATGAATTTAACCAATTTTAT
GAGCAGACAGTTTTAGGACGAGATATTGAGTTAGCTTCAGGACTTTCGATTTTTG
ATATTGATATCAGGTGTCAAACCTTGCTTAGCATTTCTTGACATTATAGAAAAGTTA
GATTGCTGTGGCAGAGGCCTTCCCTTTCATAAGGTGAGGAACGCCTGGAAGGGAA
TCTGTAGGCAGTGTAAGCATTTTTATCACGATTGGTAAAGAGGTCACCGTGCAAG
ATATTATTCTGGAGCTCAGTGAGGTGCAGCCCGAAGTGCTACCAGTTGACCTGTT
TTGTGAAGAGGAATTACCAAACGAGCAGGAAACGGAGGAGGAGCCTGACAACG
AAAGGATCTCTTACAAAGTTATAGCTCCGTGCGGTTGCAGGAAGCTGTGAGGTCAA
GCTTCGCATTTTTGTCCACGCCACAGAATTTGGTATTAGAGCTTTCCAACAGCTAC
TGACCGGAGATCTGCAGCTCCTGTGCCCCGACTGTCGCGGAAACTGCAAACATGA
CGGATCCTAATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTCTAAAGGTAGTAC
ATCTAAAGAAGGGTTTGGTGATTGGTGTTTATTGGAAGCTGACTGTAGTGATGTA
GAAAATGATTTGGGACAATTATTTGAGAGAGATACAGACTCTGATATATCGGATT
TGTTAGATGATACTGAACTGGAGCAGGGCAATTCTTTGGAAGCTATTCATCAACA
GGAGTGTGAGCAGAGCGAGGAGCAATTACAAAAACTAAAACGAAAGTATCTTAG
TCCAAAAGCTGTCGCACAGCTTAGTCCGCGACTTGAGTCAATT 3'

2) E1 ekspressioonivektori konstrueerimiseks kasutatud praimerid:

HPV5E1Xba_F-

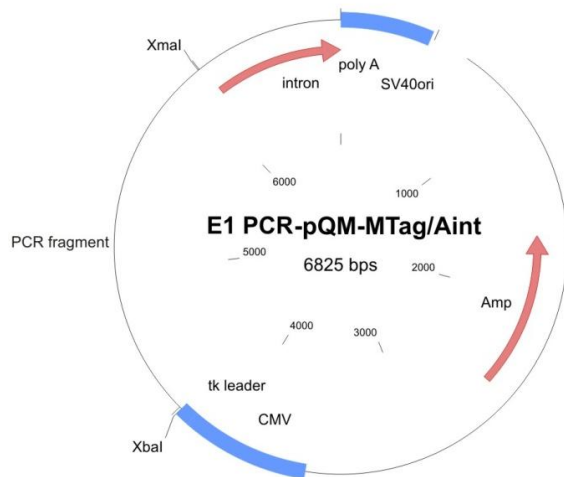
5'GGTCTAGAATGACGGGATCCTAATTCTAAAG 3'

HPV5E1Xma1_R-

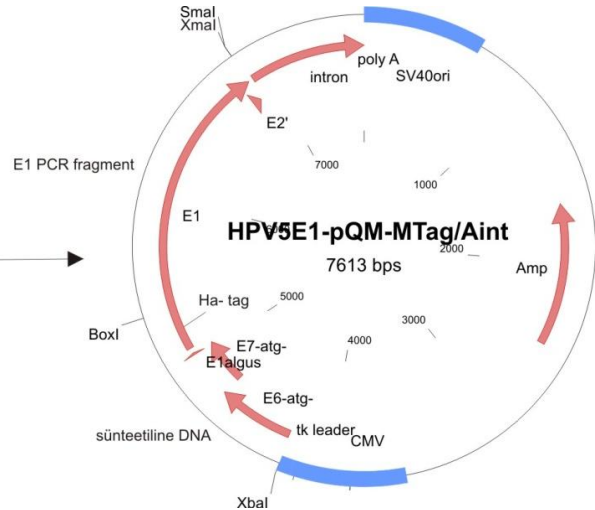
5'GTCGATTACTTGTAATACTGGGCCTA 3'

Lisa 3.

A.



B.



Joonis 16. HPV5 E1 valgu ekspressioonivektori kloneerimisskeem. HPV5 E1 ekspressioonivektor, milles HPV5 E1 valgu lugemisraami järjestus on viidud pQMNTag/Aint vektorisse CMV promooteri kontrolli alla. Kloneerimine viidi läbi kahe etapiliselt. A. E1 lugemisraami nukleotiidid 961-2781 amplifitseeriti HPV5E1XbaF ja HPV5E1_R 211praimeritega PCR- i abil. pQMNTag/Ai vektorit ja PCR- i produkti lõigati restriктаasidega *XbaI* ja *XmaI* ning ligeeriti kasutades T4 ligaasi. Esimesele poolele E1 lugemisraamile telliti sünteetiline DNA (Genewiz). Sünteesitud 1088 bp (nukleotiidid 201-1251) pikkune DNA sisaldas rikutud E6 ja E7 lugemisraame, kus ATG koodon oli muudetud ACG-ks. E1 lugemisraami on pärast neljandat aminohapet viidud sisse HA-tag, et tuvastada valku hiljem *Western blotil*. Sünteetilisest DNA-d ja E1PCR- pQMNTag/Aint konstrukti lõigati ensüümidega *BoxI* ja *XbaI* ning ligeeriti kasutades T4 ligaasi.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina: **Kristiin Albert**

sünnikuupäev: 08.05.1988

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose:

Betapapilloomiviiruste transientse replikatsiooni mehhanismi ja tekkivate intermediaatide uurimine HPV5 näitel (*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on Ene Ustav, Eve Sankovski

(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 26.06.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.13